

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
ET DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Laboratoire des Produits Naturels

Thèse de Doctorat en Biologie

Option: Produits naturels, Aspects nutritionnels et Activités Biologiques

Présentée par:

KHOLKHAL Fatima

**Etude Phytochimique et Activité Antioxydante des extraits des
composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp
*euciliatus***

Devant la commission d'examen composée de :

Mr. CHABANE Sari D.	Président	Pr. Université de Tlemcen
Mr. MAROUF A.	Examineur	Pr. Centre Universitaire de Nâama
Mr MEDDAH B.	Examineur	Pr. Université de Mascara
Mr. MOUSSAOUI A.	Examineur	Pr. Université de Béchar
Mr. LAZOUNI H. A.	Directeur de Thèse	M.C. (A) Université de Tlemcen
Mr.BENDAHOU M.	Co-Directeur dr Thèse	Pr. Université de Tlemcen

Année Universitaire 2013/2014

DEDICACE

A mes parents,

Pour vos mains qui ont tant travaillées,

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

A mes sœurs : Leila, Naima et Sara

A mes frères: Moufak, Fayçal et Houari

À mon cher mari Boumediene qui m'a tant soutenu

*A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux
moments au cours de mon cursus à l'université.*

A tous qui me connaisse de près ou de loin.



Remerciements

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Avant toute chose, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la force et la patience pour affronter ce laborieux travail de thèse réalisé au laboratoire « Produits Naturels » sous la direction de Monsieur H.A. LAZOUNI.

Il est nous est particulièrement agréable d'assurer monsieur H.A. LAZOUNI, Maître de conférences à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen de toute notre gratitude pour ses encouragements et la sympathie dont il a toujours su nous entourer. Qu'il nous soit permis de le remercier pour nous avoir confié le sujet et d'en avoir dirigé la réalisation en nous faisant bénéficier de son expérience, de sa compétence et de sa rigueur scientifique.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur M. BENDAHOU, Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen et co-directeur de thèse pour son aide et ses conseils tout le long de la réalisation de ce travail.

Monsieur D. CHABANE SARI, Professeur à l'Université de Tlemcen et Directeur du laboratoire de recherche « Produits Naturels »(LAPRONA), nous fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Qu'il nous permette de lui exprimer notre respectueuse gratitude.

Que Monsieur A. MAAROUF, Professeur au Centre Universitaire de Nâama soit remercié pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail et accepter de le juger.

Nous exprimons nos respectueux remerciements à Monsieur B. MEDDAH, Professeur à l'Université de Mascara d'avoir accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Nos vifs remerciements vont à Monsieur A. MOUSSAOUI, Professeur à l'Université de Béchar de l'amabilité avec laquelle il a accepté d'examiner ce travail.

Nos remerciements vont également à tous mes collègues du laboratoire « Produits Naturels » pour leur aide, leur soutien pendant les moments difficiles, leur gentillesse et pour leur franche camaraderie ; je citerai Mesdemoiselles A. DIDI, F. AMMAMOU, A. ZITOUNI, D. MEZOUAR, N. BELKACEM, F. GHANEMI, A. LAISSOUF, F. BEDDOU, Madame R. MEZIANE TANI, Monsieur T. CHAOUCH et sans oublier Madame F. YOUSFI secrétaire du laboratoire.

Je ne saurai oublier dans mes remerciements ma famille qui m'a soutenu dans mes choix et qui a toujours été présente à chaque fois que cela était nécessaire ; je citerai mes parents, mes sœurs et frères et notamment mon mari pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles.

Résumé

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies.

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et à l'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits de deux plantes aromatiques et médicinales de la région de Tlemcen : *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. Ce sont des plantes appartenant à la famille des Lamiacées et sont spontanées et largement répandues en Algérie. Elles sont encore utilisées dans la médecine traditionnelle dans de nombreux pays comme antiseptique et contre les problèmes respiratoires entre autres.

Les tests phytochimiques ont permis de détecter les différentes familles de composés chimiques existants dans les parties aériennes et dans les racines de ces deux plantes.

Les extractions des extraits bruts à savoir les flavonoïdes et les tannins à partir des deux parties de ces deux ssp ont été réalisées par des méthodes d'extractions à l'aide de solvants spécifiques pour chaque extrait. Les rendements sont plus importants dans la partie aérienne par rapport aux racines.

Les huiles essentielles des deux sous espèces étudiée, obtenues par hydro-distillation, ont révélé des rendements importants pendant la floraison (**0,45%**) pour la ssp *coloratus* et (**3,40%**) pour la ssp *euciliatus*.

L'évaluation du pouvoir antioxydant par quatre techniques différentes à savoir la réduction du fer FRAP, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du peroxyde d'hydrogène et la méthode de décoloration du bêta-carotène chez tous les extraits et fractions, montre qu'il y a une certaine conformité entre les quatre techniques étudiées. En effet, la fraction acétate d'éthyle des racines de la ssp *euciliatus* et la fraction acétate d'éthyle des parties aériennes de la ssp *coloratus* ainsi que l'extrait des tannins des parties aériennes pour les deux ssp étudiées présentent une activité antioxydante importante comparée à celles de l'acide ascorbique et du BHA.

Mots clés : *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*, huile essentielle, activité antioxydante, DPPH, FRAP, β -carotène, H_2O_2 .

Abstract

The antioxidant compounds are the subject of many works because, in addition to their use as conservatives in the foodstuffs by replacing synthesis antioxidants, they intervene in the treatment of many diseases.

Within the framework of discovered new antioxidants from the natural sources, we have investigated in this work, the study of phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant properties of extracts from two medicinal plants in the region of Tlemcen: *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* and, ssp *euciliatus* were of aromatic plants from the family the Lamiaceae, they are spontaneous widespread in Algeria. Have medicinal plants still used in traditional medicine in many countries as an antiseptic against respiratory problems.

The phytochemical tests permitted to detect the different families of chemical compounds existing in the aerial part and roots of both ssp.

Extractions of crude extracts, flavonoids, and tannins from the two parts of the plant were performed by extraction methods with solvents specific for each sample. Yields are higher in aerial part relative to roots.

The essential oils of two subspecies studied, obtained by hydrodistillation have revealed significant returns during flowering to 0, 45% for ssp *coloratus* and 3.40% for *euciliatus* ssp.

The evaluation of antioxidant power by four technical in all extracts and fractions, shows that there is a certain conformity between the four methods studied namely the reducing iron FRAP, trapping of free radical DPPH, trapping hydrogen peroxide and the method of bleaching of beta-carotene, the ethyl acetate fraction of the roots of *euciliatus* ssp and ethyl acetate fraction of aerial parts of the ssp *coloratus* and extract of tannins of airline parts for both ssp studied have antioxidant activity an important antioxidant activity compared to those of ascorbic acid and BHA.

Keywords: *Thymus ciliatus*, ssp *coloratus*, ssp *euciliatus*, essential oil, Antioxydant activity, DPPH, FRAP, β -carotène, H₂O₂.

ملخص

المركبات المضادة للأكسدة هي موضوع دراسات عديدة لأنه بالإضافة الي استخدامها كمواد حافظة في المواد الغذائية عن طريق استبدال المواد المضادة للأكسدة الاصطناعية انها تتدخل في علاج الكثير من الامراض.

في اطار اكتشاف مواد جديدة مضادة للأكسدة من المصادر الطبيعية اهتمنا في هذا العمل بدراسة المركبات الفينولية و تقييم الخصائص المضادة للأكسدة لمستخلصات اثنين من النباتات الطبية والعطرية في منطقة تلمسان:

Thymus ciliatus ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*

ينتميان الي عائلة *lamiacées* يتواجدان بعوفية و علي نطاق واسع في الجزائر, لا يزالان يستخدمان

في الطب التقليدي في كثير من البلدان كمطهر و ضد مشاكل الجهاز التنفسي و غيرها

قد كشفت تجارب الكيمياء النباتية عن تواجد عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية الموجودة في اوراق وجذور هذه النبات.

اجريت عمليات استخراج المقطعات الخام, مركبات الفلافونويد, العفص من كلتا جزئي النبات باستعمال وسائل الاستخراج بالمذيبات المحددة لكل عينة المرودات اعلي في الاوراق مقارنة مع الجذور.

يبين استخلاص الزيوت الاساسية للنببتين مرودات هامة خلال الفترة المزهرة 0,45% *ssp coloratus* و 3,40%

ssp euciliatus .

للكشف عن القدرة المضادة للاكسدة تم اجراء التجارب بواسطة 4 طرق مختلفة: تثبيط الجدر الحر DPPH, ارجاع الحديد , تثبيط ثاني اكسيد الهيدروجين, تثبيط ازالة لون البيتا كاروتين. تبين ان هناك توافق بين التقنيات التي شملتها الدراسة, في

الواقع خلقت الاثيل لجذور *euciliatus* و خلقت الاثيل لأوراق *coloratus* ايضا العفص لأوراق النباتين

المدروستين تظهر نشاط هاما مقارنة مع حمض الاسكوربيك و BHA.

الكلمات المفتاحية: *Thymus ciliatus*, *ssp coloratus*, *ssp euciliatus*, الزيوت الاساسية, النشاط المضاد

للاكسدة, تثبيط الجدر الحر DPPH, ارجاع الحديد, تثبيط ثاني اكسيد الهيدروجين, تثبيط ازالة لون البيتا كاروتين

Table des matières

Introduction Général.....	01
Chapitre1 : Partie Bibliographique	
I.1. Généralités sur les plantes médicinales.....	04
I.2. Domaines d'utilisation.....	04
I.3. Présentation de la famille des Lamiacées.....	05
I.4. Thym.....	06
I.4.1. Historique.....	06
I.4.2. Caractéristiques botaniques.....	07
I.4.2.1 Description.....	07
I.4.2.2 Classification.....	07
I.4.3. Répartition géographique.....	08
I.4.3.1. Dans le monde.....	08
I.4.3.2. En Algérie.....	08
I.4.4. Huile essentielle du thym.....	09
I.5. Thymol.....	10
I.5.1. Biosynthèse du thymol.....	10
I.5.2. Extraction de thymol.....	11
I.6. Description botanique du <i>Thymus ciliatus</i>	12
I.6.1. Sous-espèce <i>coloratus</i>	12
I.6.2. Sous-espèce <i>euciliatus</i>	13
I.7. Activités biologiques.....	13
I.8. Composition chimique.....	14
II. Les éléments actifs des plantes médicinales.....	15
II.1. Définition et fonctions des métabolites secondaires.....	15
II.2. Biosynthèse des métabolites secondaires.....	15
II.3. Classification des métabolites secondaires.....	16
II.3.1. Les composés phénoliques.....	16
II.3.1.1. Les principales classes des composés phénoliques.....	16
1. Acide phénolique.....	17
2. Tanins.....	18

3. Les flavonoïdes.....	19
4. Les anthocyanes.....	21
5. Coumarines.....	21
6. Les quinones.....	22
II.3.1.2. Effets biologiques des polyphénols	22
II.3.2. Les isoprénoïdes (Stéroïdes et Terpénoïdes).....	24
II.3.3. Les composés azotés (dérivés des acides aminés) Alcaloïdes.....	24
II.3.3.1. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des alcaloïdes.....	24
II.3.4. Les huiles essentielles.....	25
II.3.4.1. Localisation des huiles essentielles dans la plante.....	26
II.3.4.2. Composition chimique des huiles essentielles.....	26
II.3.4.3. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles.....	27
II.3.4.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	28
1. Distillation.....	28
2. Extraction à froid.....	29
3. Extraction assistée par micro-ondes.....	29
4. Extraction par les solvants et les graisses.....	30
5. L'extraction au CO2 supercritique.....	30
II.3.4.5. La biosynthèse.....	31
II.3.4.6. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles.....	34
III. Stress oxydant.....	35
III.1. Historique.....	35
III.2. Le stress Oxydant.....	36
III.3. Les radicaux libres.....	36
III.4. Production des radicaux libres.....	37
III.4.1. Production endogène.....	37
III.4.2. Production exogène.....	38
III.5. Les marqueurs biologiques de stress oxydant.....	39
III.6. Les maladies liées au stress oxydatif.....	40
III.7. Alimentation et stress oxydant.....	40
IV. Les antioxydants.....	41
IV.1. Les antioxydants enzymatiques.....	41
IV.2. Antioxydants non enzymatiques.....	42

IV. 3. Antioxydants d'origine végétale.....	43
IV.4. Les antioxydants synthétiques.....	43
V. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante.....	44
V.1. Introduction.....	44
V.2. Méthodes de piégeage des radicaux libres oxygénés.....	44
V.2.1. Piégeage du radical peroxyde (ROO●).....	44
V.2.2. Piégeage du radical superoxyde (O ₂ ^{·-}).....	45
V.2.3. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂ scavenging activity).....	45
V.2.4. Analyse de la capacité de piégeage du radical hydroxyle (HO●).....	45
V.2.5. Analyse de la capacité de piégeage d'acide hypochloreux (HOCl).....	46
V.2.6. Analyse de la capacité de piégeage de l'oxygène singulet (1O ₂).....	46
V.2.7. Analyse de la capacité du piégeage d'oxyde nitrique (NON●).....	46
V.3. Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction.....	46
V.3.1. Piégeage du radical 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH●).....	46
V.3.2. Puissance antioxydante de réduction du fer (analyse FRAP).....	47
V.3.3. Analyse par le réactif Folin-Ciocalteu (FC).....	47
V.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène.....	48

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

I. Introduction.....	49
II. Matériel végétal.....	49
III. Tests phytochimiques.....	51
III.1. Différentes classes recherchées.....	51
III.1.1. Les tannins.....	51
III.1.2. Les flavonoïdes.....	51
III.1.3. Les anthocyanes.....	51
III.1.4. Les coumarines.....	51
III.1.5. Les alcaloïdes.....	51
III.1.6. Stérols et triterpènes.....	52
III.1.7. Les saponosides.....	52
III.1.8. Les composés réducteurs.....	53
III.1.9. L'amidon.....	53
IV. Extraction des composés phénoliques.....	53

IV.1. Préparation des extraits bruts méthanoliques.....	53
IV.2. Extraction des flavonoïdes.....	54
IV.3. Extraction des tannins.....	55
IV.4. Calcul des rendements en extraits secs.....	56
IV.5. L'extraction d'huile essentielle.....	56
V. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles.....	58
VI. Dosage des composés phénoliques.....	61
VI.1. Dosage des phénols totaux.....	61
VI.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	61
VI.3. Dosage des tanins.....	62
VII. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	62
VII.1. CCM des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes.....	63
VII.2. CCM des extraits des tanins.....	64
VII.3. CCM des huiles essentielles.....	64
VIII. Méthode analyse de l'huile essentielle.....	64
VIII.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	64
IX. Étude de l'activité antioxydant.....	65
IX. 1. Réduction du Fer : FRAP (<i>Ferric reducing antioxydant power</i>).....	65
IX.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).....	67
IX.3. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (<i>H₂O₂ scavenging activity</i>).....	69
IX. 4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta carotène (<i>β-carotene bleaching method</i>).....	70

Chapitre 3 : Résultats

I. Screening phytochimiques.....	72
II. Les rendements en extraits secs.....	73
III. Extraction des huiles essentielles.....	75
III. 1. Résultats d'extraction par hydro-distillation.....	75
III.2. Caractères physicochimiques de l'huile essentielle.....	77
IV. Dosage des polyphénols totaux.....	78
V. Dosage des flavonoïdes.....	80
VI. Dosages des Tanins.....	81
VII. Analyse chromatographique sur couche mince.....	83
VII.1. CCM des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes.....	83

VII.2. CCM des extraits des tanins.....	89
VII.3. CCM des huiles essentielles.....	91
VIII. Chromatographie en phase gazeuse.....	94
IX. Etude de l'activité antioxydante.....	98
IX.1. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxydant power).....	99
IX.1.1. Réduction du Fer pour la ssp coloratus.....	99
IX.1.2. Réduction du Fer pour la ssp euciliatus.....	102
IX.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1- picrylhydrazyl).....	105
IX.2.1. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les substances de référence.....	106
IX.2.2. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour la ssp coloratus.....	107
IX.2.3. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour la ssp euciliatus.....	109
IX.3. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (<i>H2O2 scavenging activity</i>).....	114
IX.3.1. Piégeage du peroxyde d'hydrogène pour la ssp coloratus.....	115
IX.3.2. Piégeage du peroxyde d'hydrogène pour la ssp euciliatus.....	117
IX.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (<i>β-carotene bleaching method</i>).....	119
IX.4.1. ssp coloratus.....	119
IX.4.2. ssp euciliatus.....	122
Chapitre 4 : Discussion	126
Conclusion générale.....	138
Références bibliographiques.....	141
Les Annexe.....	164

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification botanique du thym.....	07
Tableau 02 : Localisation des principales espèces du thym en Algérie	09
Tableau 03: Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus ciliatus</i>	14
Tableau 04 : Principales classes des composés phénoliques.....	17
Tableau 05: Activités biologiques de quelques composés phénoliques.....	23
Tableau06: exemple de produits dosés couramment pour rendre compte de l'oxydation d'une cible moléculaire donnée.....	39
Tableau 07: Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques appartenant aux différentes parties de deux plantes étudiée.....	73
Tableau 08: Les rendements en extraits obtenus à partir de deux parties de la ssp coloratus et la ssp euciliatus.....	74
Tableau 09: Teneur en huile essentielle de <i>Thymus ciliatus</i> la ssp coloratus et la ssp euciliatus au cours des différents stades de développement.....	76
Tableau 10: caractéristique physiques et chimiques des deux ssp de <i>Thymus ciliatus</i>	78
Tableau11: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits Flavonoïdiques de partie aérienne et des racines de la ssp coloratus et la ssp euciliatus (système de solvants 1).....	84
Tableau12: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits flavonoïdiques de partie aérienne et des racines de la ssp coloratus et la ssp euciliatus (système de solvants 2).....	85
Tableau 13: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques (système de solvants 1).....	87
Tableau 14: Valeurs des Rf des étalons (système de solvants 2).....	87
Tableau 15: Composés identifiés dans le système 1 pour les deux espèces étudiées.....	88
Tableau 16 : Composés identifiés dans le système 2 pour les deux espèces étudiées.....	88
Tableau 17: Les résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits des tannins des partie aérienne et des racines de la ssp coloratus et la ssp euciliatus.....	89
Tableau 18 : Valeurs des Rf des étalons.....	90
Tableau 19: Composés identifiés pour les deux espèces étudiées.....	91
Tableau 20 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des huiles essentielles pour les deux ssp de <i>Thymus ciliatus</i>	93

Tableau 21: Compositions chimiques de l'huile essentielle de la ssp coloratus (Mai).....	95
Tableau 22: Compositions chimiques de l'huile essentielle de la ssp coloratus (Juin).....	96
Tableau 23: Composition chimique de l'huile essentielle de la ssp euciliatus (Juin) et (juillet).....	97
Tableau 24: Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits des deux parties pour les deux plantes étudiée.....	112
Tableau 25: Cinétique de l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits pour les deux parties étudiées de la ssp coloratus (les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions).....	115
Tableau 26: Cinétique de l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits de la ssp euciliatus pour les deux parties étudiées (les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions).....	117

Liste des figures

Figure 01: Formule structurale de thymol.....	10
Figure 02 : Mécanisme réactionnel d'ionisation-cyclisation du diphosphate de géranyle via le diphosphate de linalyle.....	11
Figure 03 : <i>Thymusciliatus</i>	12
Figure 04 : ssp coloratus.....	12
Figure 05: ssp euciliatus.....	13
Figure 06 : Biosynthèse des métabolites secondaires.....	15
Figure 07 : Structure de l'acide caféique.....	18
Figure 08 : Structure des tanins condensés et leur monomère.....	18
Figure 09 : Structure des tanins hydrolysables et les acides associés.....	19
Figure 10 : Squelette de base des flavonoïdes.....	20
Figure 11 : Structure des différentes classes des flavonoïdes.....	20
Figure 12 : Structure générale des anthocyanes (Le cation flavylum).....	21
Figure 13 : Structure de base de Coumarine.....	22
Figure 14 : Structure d'une molécule de quinone.....	22
Figure 15 : Structure de quelques alcaloïdes.....	24
Figure 16 : Structure rencontrées dans les huiles essentielles.....	27
Figure 17: schémas des étapes de l'hydro-distillation.....	28
Figure 18 : Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à vapeur.....	29
Figure 19: Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO ₂ supercritique...	30
Figure 20 : Formation d'IPP par la voie de l'acide mévalonique.....	31
Figure 21: Formation d'IPP à partir du deoxyxylulose phosphate.....	32
Figure 22 : Biosynthèse des terpènes à partir d'IPP.....	33
Figure 23 : Le passage entre les différents types de terpènes.....	33
Figure 24 : Formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et nitrogène (ERN)....	36
Figure 25 : Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène.....	38
Figure 26 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène.....	39
Figure 27 : Rôle de l'alimentation dans le métabolisme oxydatif.....	41
Figure 28 : Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO.....	42

Figure 29: Structure chimique de quelques antioxydants synthétiques.....	43
Figure 30 : Carte géographique de la station de récolte Ain Fezza – Tlemcen, Algérie.....	50
Figure 31 : Carte géographique de la station de récolte Beni Mester – Tlemcen, Algérie.....	50
Figure 32 : Protocole d'extraction des extraits bruts.....	53
Figure 33: Schéma d'extraction des flavonoïdes.....	54
Figure 34 : Protocole d'extraction des tanins.....	55
Figure 35 : Schéma d'un montage utilisé pour l'hydro-distillation.....	58
Figure 36 : Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH•.....	67
Figure 37 : Rendements en extraits obtenus à partir des deux parties de la ssp <i>coloratus</i> et la ssp <i>euciliatus</i>	75
Figure 38: Rendement en huile essentielle obtenue par hydro-distillation.....	76
Figure 39: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	79
Figure 40: Teneurs en phénols totaux pour les deux parties de deux plantes étudiées....	80
Figure 41: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	80
Figure 42 : Teneurs en flavonoïdes pour les deux parties de deux plantes étudiée.....	81
Figure 43 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins.....	82
Figure 44: Teneurs en tanins pour les deux parties de deux plantes étudiée.....	82
Figure 45 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes (système de solvants 1).....	84
Figure 46 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes (système de solvants 2).....	86
Figure 47 : Chromatogramme résultant de la CCM des extraits des tanins.....	90
Figure 48: Pouvoirs réducteurs des extraits bruts, de BHA et de l'acide ascorbique.....	99
Figure 49: Pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle), l'acide ascorbique et le BHA.....	100
Figure 50: pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction butanolique), l'acide ascorbique et le BHA.	100
Figure 51: Pouvoirs réducteurs des tanins, de BHA et de l'acide ascorbique.....	101

Figure 52: Pouvoir réducteur de tous les extraits de la ssp coloratus.....	101
Figure 53 : Pouvoirs réducteurs des extraits bruts, de BHA et de l'acide ascorbique.....	103
Figure 54: Pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction d'acétate d'éthyle), l'acide ascorbique, et le BHA	103
Figure 55 : pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction butanolique), l'acide ascorbique et le BHA.....	103
Figure 56 : Pouvoirs réducteurs des tanins, de BHA et de l'acide ascorbique.....	104
Figure 57: Pouvoir réducteur de tous les extraits de la ssp euciliatus.....	104
Figure 58: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	106
Figure 59 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHA.....	106
Figure 60: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.....	107
Figure 61: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts de deux parties étudiées de la sspcoloratus.....	107
Figure 62 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions d'acétate d'éthyle de deux parties étudiées de la ssp coloratus.....	108
Figure 63 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de deux parties étudiées de la ssp Coloratus.....	108
Figure 64 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les tannins de deux parties étudiées de la sspcoloratus.....	109
Figure 65 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts de deux parties étudiées de la ssp euciliatus.....	109
Figure 66 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions d'acétate d'éthyle de deux parties étudiées de la ssp euciliatus.....	110
Figure 67: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de deux parties étudiées de la	

ssp coloratus.....	110
Figure 68: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les tanins de deux parties étudiées de la ssp euciliatus.....	111
Figure 69: Histogramme des valeurs des concentration inhibitrices 50 des différents extraits en mg/ml.....	112
Figure 70: Histogramme de l'activité anti-radicalaire des extraits et de l'acide ascorbique et le BHA des deux plantes étudiées.....	113
Figure 71: Histogramme des pourcentages de piégeage peroxyde d'hydrogène pour les différents extraits étudiés comparés à celui du BHA pour la ssp coloratus au temps initial (t=0).....	116
Figure 72 : Histogramme des pourcentages de piégeage peroxyde d'hydrogène pour les différents extraits étudiés comparés à celui du BHA pour la ssp euciliatus au temps initial (t=0).....	118
Figure 73 : Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par l'extrait brut de la ssp coloratus.....	120
Figure 74: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction d'acétate d'éthyle de la ssp coloratus.....	120
Figure 75 : Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction butanolique de la ssp coloratus.....	121
Figure 76: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par les tanins de la ssp coloratus.....	122
Figure 77: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par l'extrait brut de la ssp euciliatus.....	122
Figure 78: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction d'acétate d'éthyle de la ssp euciliatus.....	123
Figure 79: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction butanolique de la ssp euciliatus.....	124
Figure 80: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par les tanins de la ssp euciliatus.....	124
Figure 81 : Pourcentage d'inhibition de la décoloration de la β -carotène.....	125
Figure82 : Piégeage des ROS (R) par les flavonoides.....	132

Liste des photos

Photo01: Montage de la technique d'extraction par hydro-distillation.....	57
Photo 02: Réduction du fer ferrique en fer ferreux.....	66
Photo 3 : Réduction de radical DPPH (de couleur violette au diphenyl picryl-hydrazine (de couleur jaune).....	67

Liste des abréviations

Ac: Acide.

Asc•- : Radical ascorbyle.

AAPH : [(2,2'-azobis(2-amidinopropane)dichloride].

AFNOR : Association Française de normalisation.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

BHA : Butylhydroxyanisole.

BHT : Butylhydroxytoluène.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

°C : Degré celcius.

Cu : Cuivre

cm : Centimètre.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

Fe: Fer

Fe³⁺: Fer ferrique.

FRAP: Ferric reducing antioxydant power.

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

g: Gramme

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène.

HClO: Acide l'acide hypochloreux

HO• : Radical hydroxyle

HgCl₂ : Chlorure de mercure

HCl : Acide chlorhydrique.

H₂SO₄ : Acide Sulfurique.

h: Heur

H₂O : Eau distillée.

IC₅₀: Concentration inhibitrice de 50% (Inhibitory Concentration of 50%).

I: Indices.

I₂: Iode.

I % : Pourcentage d'inhibition

KI : Iodure de potassium.

MVA: mevalonate.

M: Molarité

mg: milligramme

MDA : Malondialdéhyde .

min : Minute.

mL : Millilitre.

NaNO₂ : Nitrite de sodium

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NaOH : Soude.

nm : Nanomètre.

O₂⁻ : Radical superoxyde.

pH : Potentiel d'hydrogène.

Rdt: Rendement

ROO•: Radical peroxyde

RO₂• : Radical peroxyde

ROS : Reactive Oxygen Species (espèces réactive de l'oxygène).

R_f : Facteur de rétention

ssp : Sous espèce.

SOD : Superoxyde dismutase.

T° : Température.

UV : Ultra violet.

Vit : Vitamine

V : Volume.

V/V : Volume à Volume.

V/ m : Volume à masse.

Zn : zinc

µg : Microgramme

% : Pourcent.

µl : Microlitre.

% : Pourcentage.

Introduction générale

De part sa situation géographique particulière, l'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe, le Sahara et est auteur de points d'eau. Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie algérienne et pour le maintien de l'équilibre écologique de la région.

Du fait de leurs abondances dans la nature et de leurs utilisations par les populations locales pour se soigner, certaines plantes se sont imposées dans le monde médical.

Depuis des millénaires, l'homme puise dans son environnement les connaissances nécessaires à sa survie et à son bien être. Avant même de posséder l'usage du langage, il pouvait transmettre l'expérience de la médecine et de tous types de remèdes naturels pour finalement élaborer ce que nous appelons aujourd'hui « la médecine traditionnelle ».

« La médecine traditionnelle réunit l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales » (OMS, 2009).

Ces dernières années, le recours à la médecine traditionnelle s'est répandu partout dans le monde et a gagné en popularité, non seulement les populations des pays en développement qui y ont accès, mais aussi ceux des pays où la biomédecine occupe une grande place dans les systèmes de santé. L'étude de ces connaissances ancestrales par les sciences modernes révèle progressivement quelques secrets de la nature qui permettent à l'homme de poursuivre son évolution.

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules antioxydantes naturelles qui agissent comme captateurs de radicaux libres. Ces derniers sont produits quotidiennement par l'organisme. Ce sont des composés très réactifs comportant un électron célibataire et nécessaires à des mécanismes vitaux. La surproduction de ces radicaux peut être néfaste pour l'organisme. En effet, ils endommagent de nombreux composants cellulaires aussi divers tels que les protéines, les lipides ou l'ADN en entraînant un stress oxydatif.

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt dans le traitement de certaines pathologies, ils sont aussi utilisés pour la conservation des denrées comestibles pour l'industrie agroalimentaire (par exemple empêcher l'oxydation des lipides) (**Pan et al., 2008**).

Au bout des dernières années les antioxydants commerciaux utilisés étaient des antioxydants synthétiques tels que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), le tertibutylhydroquinone (TBHQ) et le propylgallate (PG) ; mais ils ont été suspectés de posséder une certaine toxicité et qu'ils étaient responsables de dommages causés dans le foie et de carcinogénèse. De ce fait, l'importance des antioxydants s'est focalisée sur le développement de la recherche et l'isolation des antioxydants naturels à partir des végétaux et cela pour remplacer ceux qui sont synthétiques (**Pan et al., 2008 ; Atmani et al., 2009**).

La plupart des antioxydants isolés à partir des plantes sont des polyphénols. Dans cette famille, on retrouve une classe de métabolites secondaires reconnus responsables de ces nombreuses activités biologiques comme les flavonoïdes qui sont dotés d'activités antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes (**Ghedira, 2005**).

Plusieurs études ont confirmé la contribution des polyphénols et des flavonoïdes des extraits végétaux à l'activité antioxydante *in vitro*. On peut citer par exemple les travaux réalisés par **Ding et al., 2008 ; Iacopini et al., 2008 ; Vasco et al., 2008 ; Alén_Ruiz et al., 2009 ; Borneo et al., 2009**.

Les plantes constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives.

Notre étude consiste à la recherche de l'activité antioxydante des extraits de deux plantes aromatiques, *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*, qui appartiennent à la famille des Lamiacées. Elles sont parmi les familles de plantes les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à qualité médicale intéressante.

La sélection de ces plantes est motivée par le fait qu'elles sont parmi les plantes aromatiques les plus populaires utilisées dans le monde entier. Elles sont employées fréquemment par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle et, aussi leurs huiles essentielles dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Aussi, leur efficacité est reconnue traditionnellement dans le traitement symptomatique de troubles de l'appareil digestif supérieur. Ces deux plantes représentent un sujet de recherche scientifique intéressant.

Le présent travail est une contribution dans la valorisation des principes actifs contenus dans la flore algérienne peu connue jusqu'à présent et est présenté comme suit:

- ❖ Le premier chapitre aborde une étude bibliographique préalable réalisée sur les espèces, les métabolites secondaires, les oxydants et les antioxydants.
- ❖ Le second décrit le matériel et les méthodes utilisés dans notre travail.
- ❖ Le troisième est consacré aux résultats expérimentaux trouvés et qui portent sur :

- Un screening phytochimique réalisé sur les métabolites secondaires de ces deux sous espèces.
- Des extractions des substances naturelles et un dosage des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins.
- Une étude de l'activité antioxydante des extraits de cette plante par quatre techniques à savoir la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du peroxyde d'hydrogène et l'activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta carotène.

Chapitre 1 : Partie Bibliographique

I.1. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme puisqu'il s'en sert pour se nourrir, se soigner et parfois dans ses rites religieux.

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaire des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, indienne et du Proche-Orient. Elle est devenue certainement un art. Au fil des siècles, la thérapeutique par les plantes s'est dissociée des pratiques magiques pour devenir empirique puis scientifique. Cela était évident au début du 19^{ème} siècle qui marque la découverte des alcaloïdes (la morphine, la strychnine, la quinine...).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques. Ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable. Les objectifs fixés sont l'inventaire ainsi que l'évaluation chimique et pharmaceutique des plantes médicinales algériennes dans le double but de valoriser et de rationaliser leur usage traditionnel et d'isoler des composés d'intérêt thérapeutique potentiel **(Benkiki, 2006)**.

Les plantes médicinales sont toutes les plantes qui auraient une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques. Cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain.

Elles sont utilisées en pharmacie humaine et vétérinaire, en cosmétologie ainsi que dans la confection de boissons, soit nature, soit en préparation galénique ou encore sous forme de principes actifs comme matière pour l'obtention de médicaments **(Naghbi et al., 2005 ; Babulka, 2007)**.

I.2. Domaines d'utilisation

Les herbes ont été utilisées dans plusieurs domaines y compris la médecine, la nutrition, la teinture, les cosmétiques, ainsi que dans d'autres domaines d'industrie **(Djeridane et al., 2006)**.

Un certain nombre de plantes médicinales sont encore utilisées de nos jours sous forme de décoctions et d'infusions, mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres **(Bourrel, 1993)**. Certaines plantes sont utilisées comme traitement du rhume et de la fièvre (*Marrubium*

vulgare et *Rosmarinus officinalis*), troubles d'estomac (*Mentha spicata*) (Venderjagt *et al.*, 2002), dans les traitements des maladies rénales (*Coriandrum sativum*) (Aissaoui *et al.*, 2008), et plusieurs d'entre elles sont utilisées pour leurs effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (Rasekh *et al.*, 2001 ; Kanko *et al.*, 2004).

Quelques espèces de *Helichrysum* ont été utilisées pendant 2000 ans passés comme forme de thé grâce à leurs effets régulateur de la bile et diurétique (Suzgeç *et al.*, 2005).

En nutrition, plusieurs espèces sont utilisées comme épice, colorant, boisson, ou encore pour leur effet aromatique (Suzgeç *et al.*, 2005).

Hippomarathrum microcarpum est utilisée en nutrition par la population Turque (Hakan *et al.*, 2007).

D'autre part, il existe une augmentation en intérêt des antioxydants naturels, particulièrement ceux qui ont tendance à présumer les effets de délétion du radical libre dans le corps humain, et de prévenir la détérioration de la matière grasse et d'autres constituants de la denrée alimentaire (Bounatirou *et al.*, 2007).

Plusieurs espèces appartenant à la famille des Lamiacées, font actuellement l'objet d'études phytochimiques visant à découvrir de nouveaux antioxydants (Hennebelle, 2006).

I.3. Présentation de la famille des Lamiacées

La région méditerranéenne d'une manière générale et l'Algérie en particulier, avec son climat doux et ensoleillé est particulièrement favorable à la culture des plantes aromatiques et médicinales. La production des huiles essentielles à partir de ces plantes pourrait constituer à ce titre une source économique importante pour notre pays. Cette étude porte sur la famille des Lamiacées.

La famille des Lamiacées est l'une des plus répandues dans le règne végétal (Naghbi *et al.*, 2005).

C'est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en thérapeutique. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (Gherman *et al.*, 2000 ; Bouhdid *et al.*, 2006 ; Hilan *et al.*, 2006). Il est bien connu que les huiles essentielles extraites des plantes de cette famille possèdent des propriétés pharmacologiques tant sur le plan humain qu'industriel. De nombreuses propriétés leur sont conférées : anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgiques, toniques, digestives, cicatrisantes... Les huiles essentielles par la diversité des constituants qui les composent, sont des substances très actives (Bakkali *et al.*, 2008 ; Hilan *et al.*, 2006).

Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres (Miller *et al.*, 2006). La région méditerranéenne a été le centre principal pour domestication et culture de Labiatae (Naghibi *et al.*, 2005).

Les genres les plus cités dans la littérature sont : *Salvia officinalis* (Fellah *et al.*, 2006), *Mentha spicata* (Choudhury *et al.*, 2006), *Origanum vulgare* (Dimitrijevic *et al.*, 2007), *Rosmarinus officinalis* (Gachkar *et al.*, 2007 ; Marzouk *et al.*, 2006), *Ocimum basilicum* (Lee *et al.*, 2005) ainsi que de nombreuses espèces du genre *Thymus* qui ont été abondamment étudiées de ce point de vue (Rota *et al.*, 2008 ; Bagamboula *et al.*, 2004 ; Elhabazik *et al.*, 2006 ; Ebrahimi *et al.*, 2008). Un très grand nombre de genre de la famille des Lamiacée sont des sources riches en terpénoïdes, flavonoïdes, iridiodes glycosylés et composés phénoliques (Naghibi *et al.*, 2005). Le genre *Thymus* représentant l'objectif de notre recherche regroupe plus de 250 espèces (Miller *et al.*, 2006) largement distribuées dans l'aire méditerranéenne et utilisées comme antibactériens, anti-inflammatoires et antioxydants dans la pharmacopée traditionnelle de la région (Bouhdid *et al.*, 2006 ; Ebrahimi *et al.*, 2008).

I.4. Thym

I.4.1. Historique

Le terme « Thym » est apparu dans la langue française au XII^e siècle, d'abord sous la forme de « tym » selon certaines sources. Il est dérivé du latin *thymus* qui l'a emprunté du grec *thumos* signifiant, de façon quelque peu obscure, « grosseur ou loupe » (par référence à la glande, le *thymus*). D'autres pensent plutôt que le mot vient du grec *thymos* ou *thyein* qui signifie « fumée », par allusion au fait qu'il était jadis brûlé comme encens et qu'on lui attribuait alors le pouvoir d'éloigner les créatures venimeuses. D'autres enfin, font dériver le mot du grec *thumus*, qui signifie « courage », la plante étant jadis considérée comme revigorante.

Il semblerait que, pendant longtemps, le thym ait surtout été utilisé en médecine et dans les rituels religieux ou magiques, ses usages culinaires se limitant à aromatiser le fromage et les liqueurs. Les égyptiens s'en servaient pour embaumer leurs morts, les grecs pour parfumer les temples et l'eau des bains et les Romains pour purifier leurs appartements.

De nos jours, le thym est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne. Ses feuilles sont riches en huiles essentielles dont les propriétés sont mises à profit en phytothérapie et en médecine, comme produit vétérinaire (antiparasites, antispasmodique, antiseptique et digestif). Cela a été mentionné dans plusieurs études (Ebrahimi *et al.*, 2008 ;

Rasooli et al., 2006 ; Cosentino et al., 1999). Il est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, hypertension et gastrites, en usage externe comme cicatrisants. Il possède des vertus antiseptiques utilisées pour soigner les infections pulmonaires, calmer les toux quinteuses, diminuer les sécrétions nasales et soulager les problèmes intestinaux comme il a été rapporté par certains auteurs (**Rasooli et al., 2006 ; Adwan et al., 2006 ; Soto-Mendivil et al., 2006**).

I.4.2. Caractéristiques botaniques

I.4.2.1 Description

Les thym (Thymus) sont des plantes basses sous-ligneuses, pouvant atteindre 40cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur verte foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono-terpènes. Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par la rose (**Soto-Mendivil et al., 2006**).

I.4.2.2 Classification

La classification botanique de thym est présentée dans le **tableau n°1**

Tableau 1 : Classification botanique du thym

Règne	Plantae (végétal)
Embranchement	Spermaphytes (phanérogames)
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Métachlamydées (gamopétales)
Ordre	Tubiflorales
Sous ordre	Verbéninées
Famille	Labiacées (labiées)
Genre	<i>Thymus</i>

I.4.3. Répartition géographique

I.4.3.1. Dans le monde

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées (Naghbi *et al.*, 2005). Selon Dob *et al.* (2006), il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée. C'est une plante très répandue dans le nord ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye). Elle pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte. On peut la trouver également en Sibérie et même en Himalaya.

Selon une étude menée par Nickavar *et al.*, (2005), environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen. C'est pour cela que l'on peut considérer la région méditerranéenne comme étant le centre de ce genre.

I.4.3.2. En Algérie

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Le *Thymus* de la famille des Lamiacées ou Labiées, comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (Saidj *et al.*, 2006). Il est représenté en Algérie par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement. Sa répartition géographique est représentée dans le **tableau n°2**.

Tableau 2 : Localisation des principales espèces du thym en Algérie (Saidj *et al.*, 2006).

Espèces	Découverte par	Localisation	Nom local
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen	–
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie	–
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran	–
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous secteur de l’atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne, Tell constantinois	Tizaartarte
<i>Thymus guyonii</i>	Noé	Rare dans le sous secteur des Hauts plateaux Algérois, Oranais et constantinois	–
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans : Le secteur de l’atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous secteur des Hauts plateaux algérois, Oranais (Tiaret) et constantinois	Zaâteur
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous secteur de l’Atlas Saharien et constantinois	Zizerdite
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral	Djertil Hamrya
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous secteur des Hauts Plateaux Algérois	–
<i>Thymus algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous secteur des Hauts Plateaux Algérois et Oranais	Djertil Zaitra
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord Algérois	Djertil

I.4.4. Huile essentielle du thym

L’essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives (Rasooli *et al.*, 2006 ; Naghdi *et al.*, 2004). Les huiles essentielles de thym sont composées par des molécules aromatiques d’origine végétale présentant une très grande diversité de structure.

La variabilité chimique des huiles essentielles de thym dépend de plusieurs facteurs qui sont généralement d'ordres climatiques et environnementaux mais, qui peuvent être aussi d'ordres génétique et saisonnier (stade végétale) (**Loziene et al., 2007**). Ainsi, une étude menée par **Dob et al., (2006)** sur les *Thymus* d'Afrique du Nord a montré que le composé majoritaire est le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de Tunisie.

I.5. Thymol

Le thymol est l'un des principaux phénols reconnus dans l'huile essentielle de quelques lamiacées comme le thym, l'origan et la sarriette dont le contenu peut atteindre jusqu'à 84% (**Kaloustian et al., 2008**). Le thymol a été découvert par **Caspar Neumann** en **1719** et épuré en **1853** par **M. Lallemand** qui lui a donné le nom « thymol » et lui a attribué la formule $C_{20}H_{14}O_2$ formule qui aujourd'hui, correspond à $C_{10}H_{14}O$ de la nouvelle notation. Le thymol est un phénol (2-isopropyl-5-méthyl-phénol) et est isomérique avec le carvacrol (2-isopropyl-5-méthyl-phénol).

Le thymol existe dans l'huile de thym et est lié à d'autres hydrocarbures d'une plus grande volatilité comme le p-cymène ($C_{10}H_{14}$) et le thymène ($C_{10}H_{16}$) (**Pauli et Knobloch 1987**).

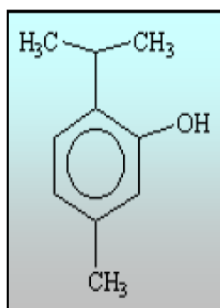


Figure 1: Formule structurale de thymol (**Botelho et al., 2007**).

Plusieurs études ont montré que le thymol possède de nombreuses activités biologiques telles que l'activité antispasmodique, antimicrobienne, fongicide, insecticide, antioxydant, anticarcinogène et anti-inflammatoire (**Ipek et al., 2005 ; Szentandrassy et al., 2003**).

I.5.1. Biosynthèse du thymol

Actuellement, le diphosphate de géranyle (GPP) est considéré comme le précurseur physiologique universel des monoterpènes et son isomérisation s'impose avant la cyclisation. Cette dernière passe par l'intermédiaire de son isomère allylique tertiaire, le diphosphate de linalyle (LPP). Il a été récemment établi que le LPP se lie effectivement à l'enzyme pendant les processus de cyclisation. Les monoterpènes cycliques dérivent d'un même mécanisme réactionnel électrophile (**figure 02**). Il s'agit d'un cation terpényle-8, véritable plaque

tournante dans la biogénèse des mono-terpènes cycliques. En effet, on peut concevoir facilement qu'il soit à l'origine du limonène, du terpinolène et de l' α -terpinéol (**Figure 02**). Il peut également donner le cation terpényle-4, précurseur immédiat commun de l' α -et du γ -terpinène ainsi que du terpinène-4-ol (**Lamarti et al., 1994**).

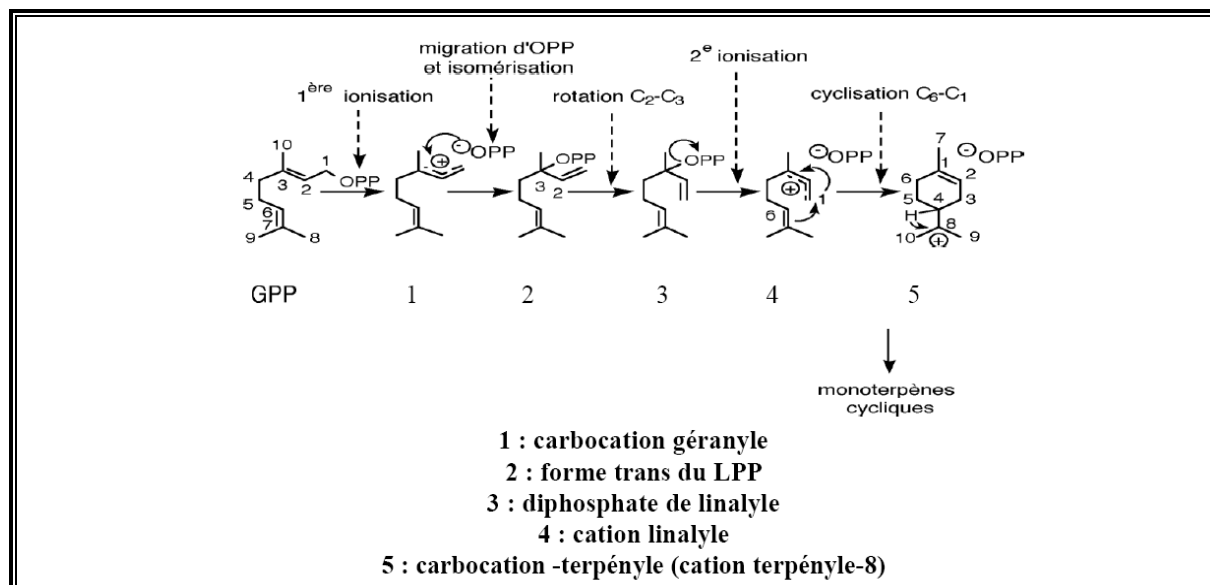


Figure 2 : Mécanisme réactionnel d'ionisation-cyclisation du diphosphate de géranyle via le diphosphate de linalyle (**Lamarti et al., 1994**).

Certains mono-terpènes monocycliques tels, le limonène, le terpinolène, l' α -terpinène, etc., présentent une structure chimique apparentée et peuvent être métaboliquement inter-convertis. Ainsi, **Koba et al., (2004)** ont montré que le terpinène-4-ol peut donner l' α - ou le γ -terpinène par simple déshydrogénation. Par la même réaction, le γ -terpinène peut donner le p-cymène, précurseur immédiat commun de thymol et de son isomère, le carvacol.

En effet, **Lamarti et al., (1994)** ont rapporté que les mono-terpènes cyclases produisent à partir du GPP une variété de mono-terpènes cycliques. Les réactions catalysées par ces enzymes sont régi-spécifiques et exigent des ions bivalents afin de neutraliser la charge négative du groupement diphosphate et d'aider ainsi à l'ionisation du GPP.

I.5.2. Extraction de thymol

Le thymol, isolé par cristallisation sous l'action du froid ou par traitement de l'huile essentielle de thym avec une solution de soude caustique, provoque l'élimination des hydrocarbures formant la couche de verseur et, la solution inférieure contenant le thymolate de sodium ($C_{10}H_{23}ONa$) est neutralisée avec l'acide chlorhydrique. Le thymol vient surnager à la surface de liqueur et est recueilli par décantation ou en utilisant un dissolvant approprié suivie d'une recristallisation alcoolique (**Pauli et Knobloch 1987**).

I.6. Description botanique du *Thymus ciliatus*

Thymus ciliatus (Desf) Benth. Est un arbrisseau de petite taille, mais pouvant former des touffes bien étalées sur le sol ; les feuilles florales sont différentes des feuilles caulinaires, en général fortement dilatées à leur portion inférieure. Rencontrée dans les broussailles, matorrals, sur substrats calcaires et siliceux et sur sols rocailleux et bien drainés (**Benabid, 2000**).



Figure 3 : *Thymus ciliatus*

I.6.1. Sous-espèce coloratus

La sous-espèce coloratus est un sous arbrisseaux très rameaux à capitule dense, gros et à feuilles florales plus ou moins tachées de pourpre au moins à la base. Les fleurs ne dépassent pas 7 à 8mm et sont en général plus pales (**Quezel et Santa, 1963**).



Figure 4 : ssp coloratus

I.6.2. Sous-espèce *euciliatus*

La ssp *euciliatus* possède des fleurs très grandes rouges ou violacées dépassant 1cm de long, les feuilles sont linéaires ciliées sur les marges, florales ovales et vertes (Quezel et Santa, 1963).



Figure 5: ssp *euciliatus*

I.7. Activités biologiques

Le thym est la plante médicinale la plus utilisée en médecine traditionnelle algérienne comme expectorant, antitussif, antiseptique, stomachique, antispasmodique, carminatif, anthelminthique et diurétique. Il est aussi utilisé comme condiment: le thym sec, ayant subi un séchage préalable permettant sa conservation, est destiné aux grillades alors que les huiles essentielles, extraites du matériel végétal, servent d'aromatisants. En usage cosmétique, l'emploi du thym est classique dans la constitution des parfums, on trouve également, dans l'huile essentielle du thym une composante antiseptique et cicatrisante dans les produits destinés aux soins de beauté (Kosaka *et al.*, 2000) ; (Tanaka, 2003). Les études ont surtout montré l'activité anti-oxydante (Kulevanova et Panovska, 2002) ; (Dugas *et al.*, 2000) des espèces de genre *Thymus* étudiées. Les activités, antimicrobiennes (Saeki *et al.*, 1989) ; (Kandil *et al.*, 1994), spasmolytique et mutagénique (Kazuyasu *et al.*, 1995) (vis-à-vis de la bactérie *Salmonella triphymurium*) ont été établies.

I.8. Composition chimique

Les principaux métabolites secondaires du genre *Thymus* sont les flavonoïdes. Le genre *Thymus* appartient à la sous-famille des Nepetoideae réputée pour stocker des flavonoïdes polyméthoxylés, (Ismaili *et al.*, 2001) ; (Haraguchi *et al.*, 1996). La lutéoline et la 6-hydroxylutéoline sont des chémomarqueurs des espèces *Thymus*, la thymusine (5,6-dihydroxy-7, 8,4'-triméthoxyflavone) est aussi caractéristique de cette sous-famille.

L'huile essentielle de *Thymus ciliatus* est composée principalement de thymol, de β -E-ocimène et d' α -terpinène accompagnés d'autres constituants à des teneurs relativement faibles : linalol, δ -3-carène, 1,8-cinéole et carvacrol (Benabid, 2000).

Tableau 3: Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus ciliatus*.

N°	Composés	%	IK (indice de Kovàt)
1	α -thujène	0,64	926
2	α -pinène	0,35	931
3	sabinène	0,56	976
4	δ -3-carène	3.1	1 011
5	α -terpinène	12,3	1 018
6	1,8-cinéole	2.63	1 033
7	β -E-ocimène	25.8	1 050
8	γ -terpinène	0.74	1 062
9	linalol	3.24	1 098
10	terpin-4-ol	0.5	1177
11	thymolméthyléther	0.23	1235
12	thymol	44.2	1 290
13	xyde de caryophyllène	0.25	592 1
14	p-cymène	0,47	1 026

II. Les éléments actifs des plantes médicinales

La plante est le siège d'une intense activité métabolique aboutissant à la synthèse de principes actifs les plus divers. Ce processus métabolique est lié aux conditions mêmes de vie de la plante : la plante doit faire face à de multiples agressions de l'environnement dans lequel elle vit : prédateurs, microorganismes pathogènes, etc. On conçoit donc que la plante puisse développer un métabolisme particulier lui permettant de synthétiser les substances les plus diverses pour se défendre : les métabolites secondaires (Kansole, 2009).

II.1. Définition et fonctions des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes (Lutge et al., 2002 ; Abderrazak et Joël., 2007).

II.2. Biosynthèse des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires résultent généralement de trois voies de biosynthèse : la voie de shikimate, la voie de mevalonate et du pyruvate (Verpoorte et Alfermann, 2000).

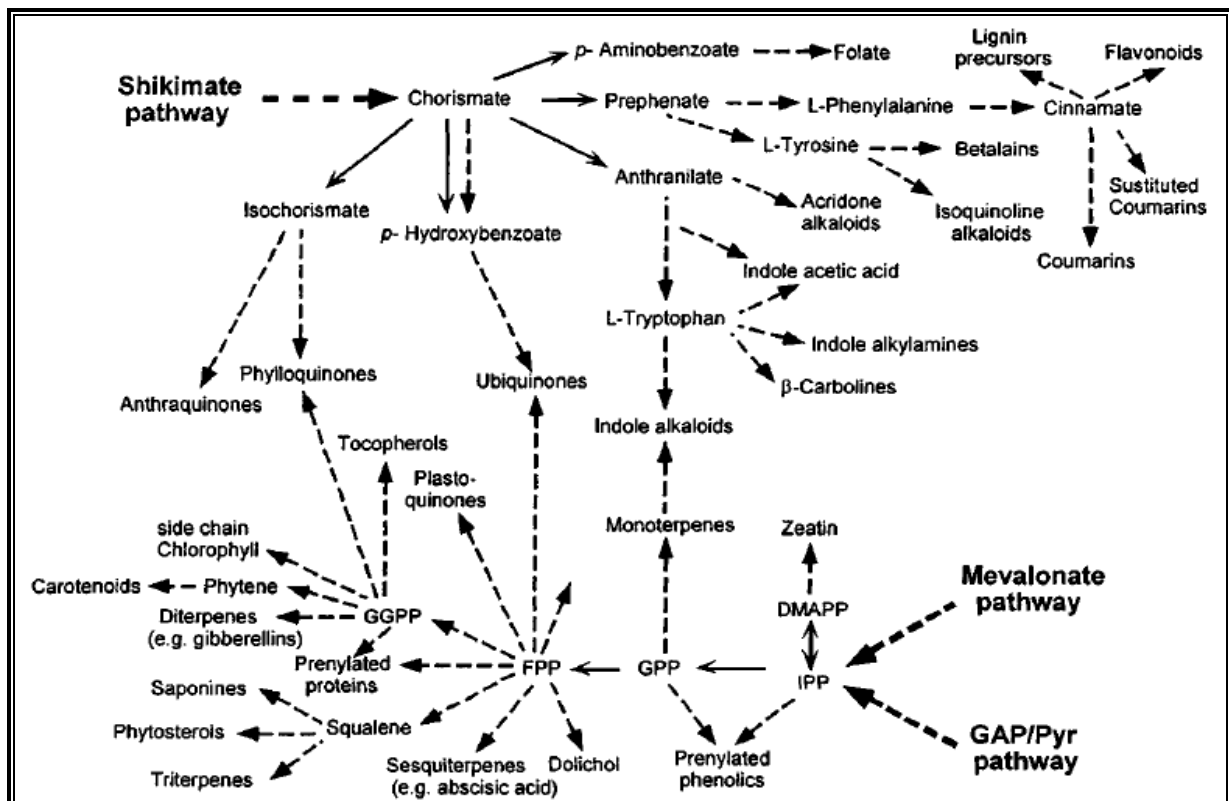


Figure 6: Biosynthèse des métabolites secondaires (Verpoorte et Alfermann, 2000 ; Wink, 2010).

II.3. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques (**Vermerris, 2006**). On distingue trois classes principales :

II.3.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. (**Lebham, 2005**). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieures (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Ils regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisé en une dizaine de classes chimiques, qui présentent tous un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles OH (**Hennebelle et al., 2004**).

Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate (**Lugasi et al., 2003**). Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes simples et pro-anthocyanidines) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes. (**Beta et al., 2005**).

II.3.1.1. Les principales classes des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (**Bruneton, 1999**). Les différentes classes de ces composés phénoliques, et les plantes qui les renferment sont représentées dans le **tableau n°4**.

Tableau 4 : Principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 1999 ; Hennebelle, 2006).

Nombre d'atome de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Plantes
6	C6	Phénols simples	Cathécol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols Benzoïques	Ac. gallique, Ac. salysalique, vanilline	Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénonnes	3-acétyl6-méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C6-C3	Acides phénols Cinnamiques	Ac. coumarique, Ac.caféique	Romarin Marronnier d'inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C6-C1-C6	Xanthonnes	Bellidifoline, mangocétine	Racine de gentiane, Centaurée
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Hydrangénol,,Pinosylvine	Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, Roténoïde	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3)2	Lignanes	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6)2	Bi flavonoïdes	Amentoflavone, Hinokiflavone	Carcinia Hypericum
N	(C6-C3-C6)n	Tanins condensés (proanthocyanidols)	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

1. Acide phénolique

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféique, férulique et sinapique (Pandey et Rizvi, 2009).

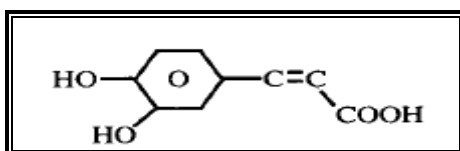


Figure 7 : Structure de l'acide caféique (Cowan, 1999).

2. Tanins

Ils sont d'origine végétale et non azotée qu'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres, les fruits (raisin, datte, café, cacao...) et les feuilles de thé. Se sont des composés polyphénoliques, solubles dans l'eau de masse molaire entre 500-2000D, de structures variées ayant en commun la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les protéines. (Vermeris *et al.*, 2006).

Utilisés depuis l'antiquité par l'homme pour le traitement des peaux d'animaux, les tanins ont une importance économique et écologique importante parmi les caractéristiques des tanins le goût astringence qui est une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche (Peronny, 2005).

➤ Structure et classification

Les tanins sont classés en deux groupes selon leur structure chimique : les tanins condensés et les tanins hydrolysables :

❖ Les tanins condensés (pro-anthocyanidines)

De structure plus complexe, on les appelle également pro-anthocyanidines, largement présents dans le règne végétal, et que l'on rencontre dans de nombreux produits alimentaires (fruit, légumes, boissons....) (Peronny, 2005).

Ils ne renferment pas de sucres dans leur molécule ; ils ne sont hydrolysés ni par les acides, ni par les tannasses mais en présence d'acide forts ou d'agents d'oxydation, ils se transforment en substances rouges : les phlobaphènes (exemple : rouge de cola) (Atefeibu, 2002). Ce sont des polymères de flavan-3-ols, appelés aussi catéchines et de flavan-3,4-diols appelés leuco-anthocyanidines ou un mélange des deux (Atefeibu, 2002 ; Peronny, 2005).

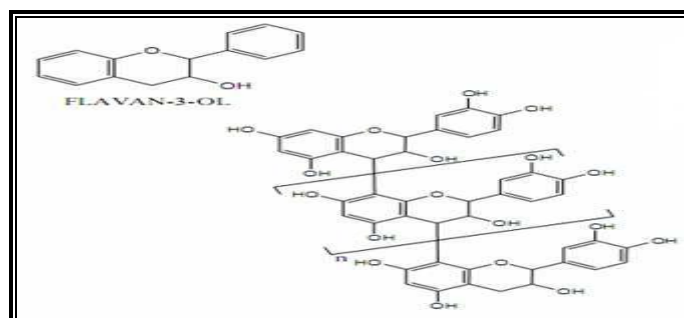


Figure 8 : Structure des tanins condensés et leur monomère (Peronny, 2005).

❖ Tanins hydrolysables

Ce sont des esters de glucose, ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (le plus souvent du glucose ou de l'acide quinique) et une partie phénolique qui peut être de l'acide gallique (**Macheix et al., 2005**).

Ils sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbonées à carbone entre noyaux (liaisons biphenyle réalisées par couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins éllagiques (**Bessas et al., 2007**).

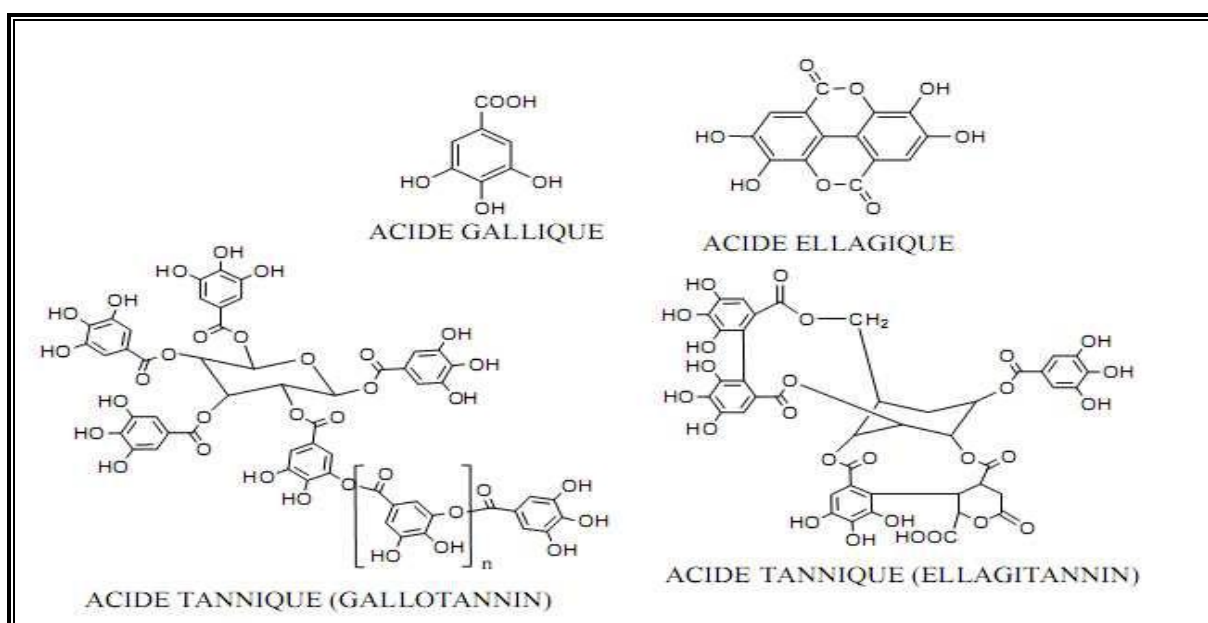


Figure 9 : Structure des tanins hydrolysables et les acides associés (**Peronny, 2005**).

3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal (**Ghedira, 2005**), qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols.

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (**Beecher, 2003 ; Williams et Grayer, 2004 ; Kueny-Stotz, 2008**).

➤ **Structure chimique et classification**

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyran (Skerget *et al.*, 2005). Leur structure de base est celle d'un diphenylpropane à 15 atomes de carbone (C6-C3 -C6), constitué de deux noyaux aromatiques (ou anneaux) que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygénés, qui désigne la lettre C (figure 10) (Dacosta, 2003).

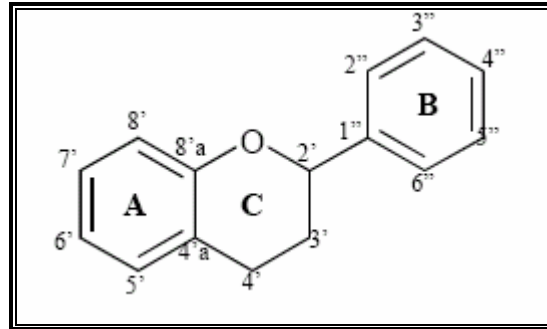


Figure 10 : Squelette de base des flavonoïdes (Girotti-Chanu, 2006).

De façon générale les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont dits aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides, et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose, ils peuvent en outre être des monomères ou des oligomères (Dacosta, 2003).

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont: flavones, isoflavandiols, flavanols, flavondiols, aurones, chalcones, anthocyanins

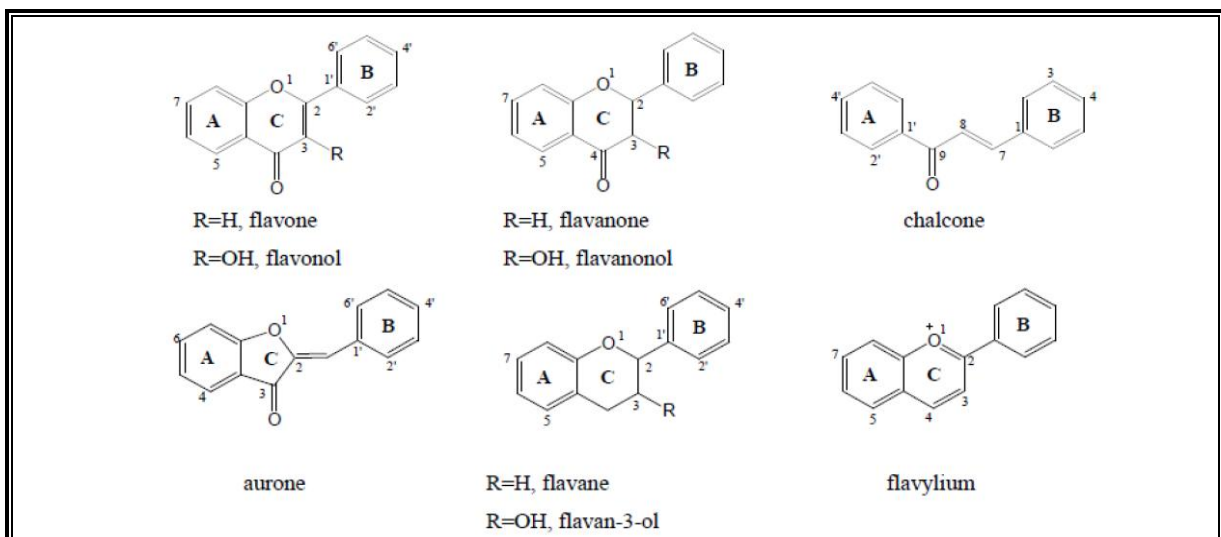


Figure 11 : Structure des différentes classes des flavonoïdes (Martinez *et al.*, 2005).

4. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des bays rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplis d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (**Bessas et al., 2007**).

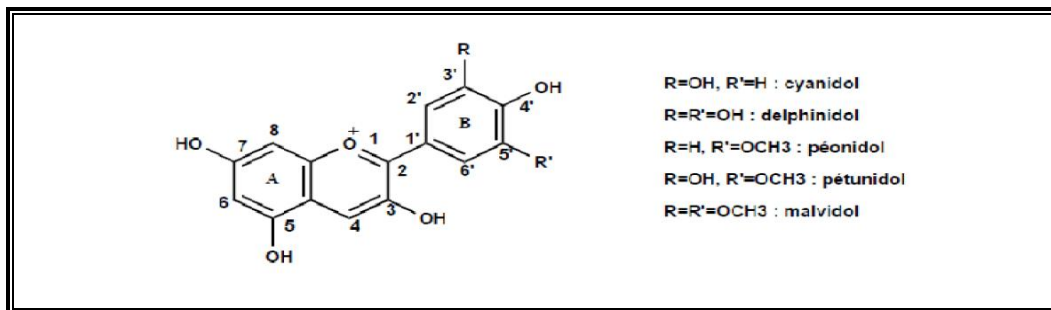


Figure 12 : Structure générale des anthocyanes (Le cation flavylum).

5. Coumarines

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels et donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien. Les familles les plus riches en coumarines sont : les Légumineuses, Rutacées, Apiécées et Thymelacées. Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et les huiles essentielles des graines (**Guignard, 1998 ; Deina et al., 2003 ; Booth et al., 2004**).

Les coumarines sont des substances phénoliques synthétisées à partir de la fusion des noyaux benzènes et α -pyrone (**O'Kennedy et Thomes, 1997**). Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés alors que les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau (**Bruneton, 1999**).

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration et aussi selon l'espèce. Dans la cellule végétale elles sont principalement présentes sous forme glycosylée (**Hofmann, 2003**). Cette glycosylation est une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques de ces molécules. Elles sont considérées

comme des phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries. Les coumarines peuvent également se trouver dans le règne animal (les glandes à sécrétion odoriférante du castor) et chez certains microorganismes (**Hofmann, 2003**).

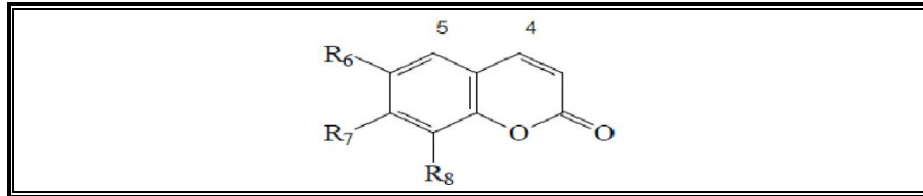


Figure 13 : Structure de base de Coumarine

6. Les quinones

Les quinones sont des noyaux aromatiques avec deux substitutions cétones. Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou oranges et possédant deux fonctions cétones. Elles sont responsables de la réaction de brunissement dans les fruits et végétaux coupés ou lésés. En plus de fournir une source de radicaux libres stables, les quinones sont connues pour se complexer de manière irréversible avec les nucléophiles des acides aminés dans les protéines. Par conséquent, les quinones inactivent les protéines et altèrent leur fonction (**Arif et al., 2009**). On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons et les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, les médicaments et dans les fongicides (**Kansole, 2009**).

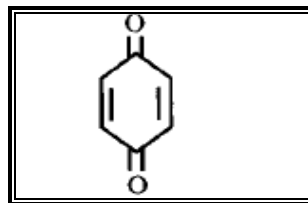


Figure 14 : Structure d'une molécule de quinone (**Cowan, 1999**).

II.3.1.2. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique.

Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes puisqu'elles comprennent plus de 6000 molécules. Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT). Les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la santé humaine (**Bounatirou et al., 2007**).

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux (**Babar Ali et al., 2007**), anti-allergènes, vasodilatateurs (**Falleh et al., 2008**) et antioxydants (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).

Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (**Makoi et Ndakidemi, 2007**). Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire à dessiner les formes pour éloigner les prédateurs. D'autre sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme vis-à-vis de certaines maladies (**Bruneton, 1999**).

Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Bruneton, 1999**). Ces activités sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 5: Activités biologiques de quelques composés phénoliques (**Bruneton 1999 ; Hennebelle, 2006**).

Composés	phénoliques	Activité biologique
Ac. Phénols	Ac. Cafeique Ac. Salicylique	Antibactérienne Antifongique, antioxydante
Tanins	Tanin gallique Proanthocyanidine	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, anti-diarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur
Flavonoïdes	Lutéoline Catéchine Hespéridine Quercétine Naringénine	Antitumorale, anticarcinogène, anti -inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur diurétique.
Coumarines	Dicoumarol	Anticoagulant, antioxydant, protectrice vasculaire et antioedémateuse

II.3.2. Les isoprénoïdes (Stéroïdes et Terpénoïdes)

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux, ils résultent de l'enchaînement de plusieurs unités isoprénique (Bhat, Nagasampigi et Sivakumar, 2005).

II.3.3. Les composés azotés (dérivés des acides aminés) Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe de composés azotés et faiblement basiques issus principalement des végétaux (Figure 15). Ils présentent des réactions communes de précipitation. Après extraction, ils sont détectés par des réactions générales de précipitation fondées sur leur capacité de se combiner avec des métaux. La caractérisation de la présence d'alcaloïde peut se faire par précipitation à l'aide de : réactif silicotungstique : réactif de Bertrand, réactif tétraiodomercure de potassium : réactif de Valser-Mayer, iodobismuthate de potassium : réactif de Dragendorff (Kansole, 2009).

En raison de leur puissante activité biologique, la plupart des alcaloïdes connus, environ 12.000, ont été exploités en tant que médicaments, stimulants, narcotiques et comme poisons. Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques (Ziegler et Facchini, 2008).

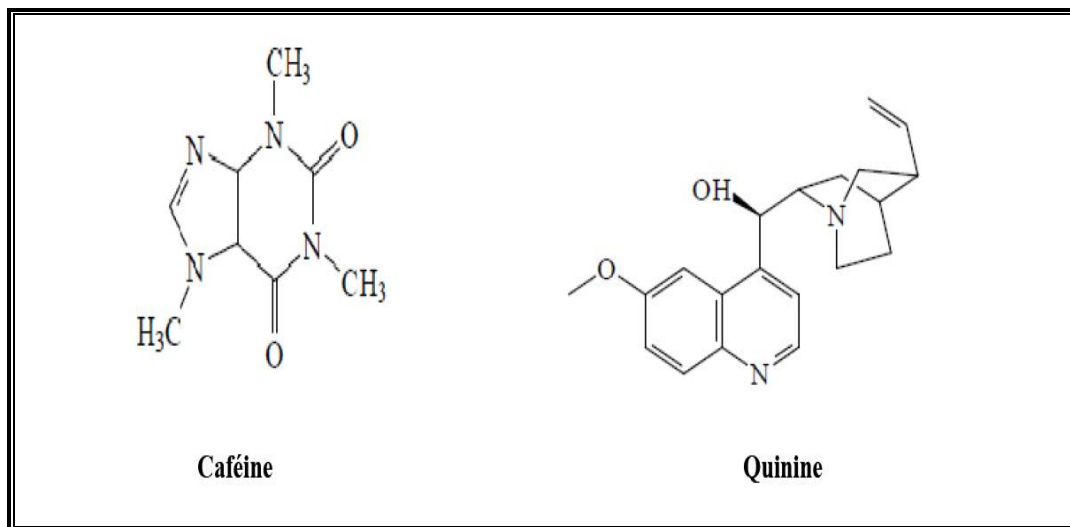


Figure 15 : Structure de quelques alcaloïdes.

II.3.3.1. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés :

- ◆ Au niveau du système nerveux central comme antidépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine),
- ◆ Au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques, parasymphatomimétiques, anti-cholinergiques et ganglioplégiques.

On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux, d'anti-fibrillants, d'anti-tumoraux, et d'antipaludiques (**Bruneton, 1999**).

II.3.4. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques que l'on extrait par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydro-distillation (**Iserin *et al.*, 2007**). Une huile essentielle peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un l'alchimiste (**Moro Buronza, 2008**).

En réalité, une huile essentielle est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif à sa composition (**Clarke, 2008**).

Une huile essentielle contient souvent de 50 à 100 molécules différentes et peut à l'extrême en comprendre jusqu'à 300 travaillant en synergie pour donner à l'huile essentielle ses propriétés (**Lahlou, 2004**). Sa composition biochimique n'est par ailleurs jamais rigoureusement identique. Il est impossible de reproduire en laboratoire cette complexité présente à l'état naturel. C'est ce qui explique notamment la grande efficacité des huiles essentielles dans le cadre de la lutte contre les bactéries, les champignons ou les virus (**Chassaing, 2006**).

Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînaibles à la vapeur d'eau, très peu solubles dans l'eau. Elles sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (**Afssaps, 2008**).

II.3.4.1. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les huiles essentielles n'existent que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus de plantes et recouvertes d'une cuticule. Ensuite, elles sont stockées dans des cellules dites cellules à huiles essentielles (Lauraceae ou Zingiberaceae), dans des poils sécréteurs (Lamiaceae), dans

des poches sécrétrices (Myrtaceae ou Rutaceae) ou dans des canaux sécréteurs (Apiacaeae ou Asteraceae).

Elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux : les fleurs (ylang-ylang, bergamotier, rose,...), les sommités fleuries (tagète, lavande,...), les feuilles (citronnelle, eucalyptus, laurier,...), les racines (vétiver), les rhizomes (gingembre, curcuma,...), les fruits (badiane,...), le bois (bois de rose, santal,...) ou les graines (ambrette, muscade,...) (**Oussala et al., 2006 ; Bruneton, 1999 ; Anton et Lobstein, 2005**).

Elles diffèrent par leur taille, leur paroi ou leur contenu, caractérisant parfois une famille donnée. Elles jouent un rôle important dans la détermination des conditions d'extraction des produits volatils qu'elles contiennent (**Bruneton, 1999**). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe (**Oussala et al., 2006**).

II.3.4.2. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes (**Bakkali et al., 2008**). Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée y sont rencontrés (soit les mono-terpènes et les sesquiterpènes de formule générale $(C_5H_8)_n$, les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluant des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones, des phénols et des oxydes. On estime qu'il y a plus de 1000 mono-terpènes dont 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phénylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (**Svoboda et Hampson, 1999**). La **figure 16** présente la structure de quelques composants retrouvés dans l'huile essentielle.

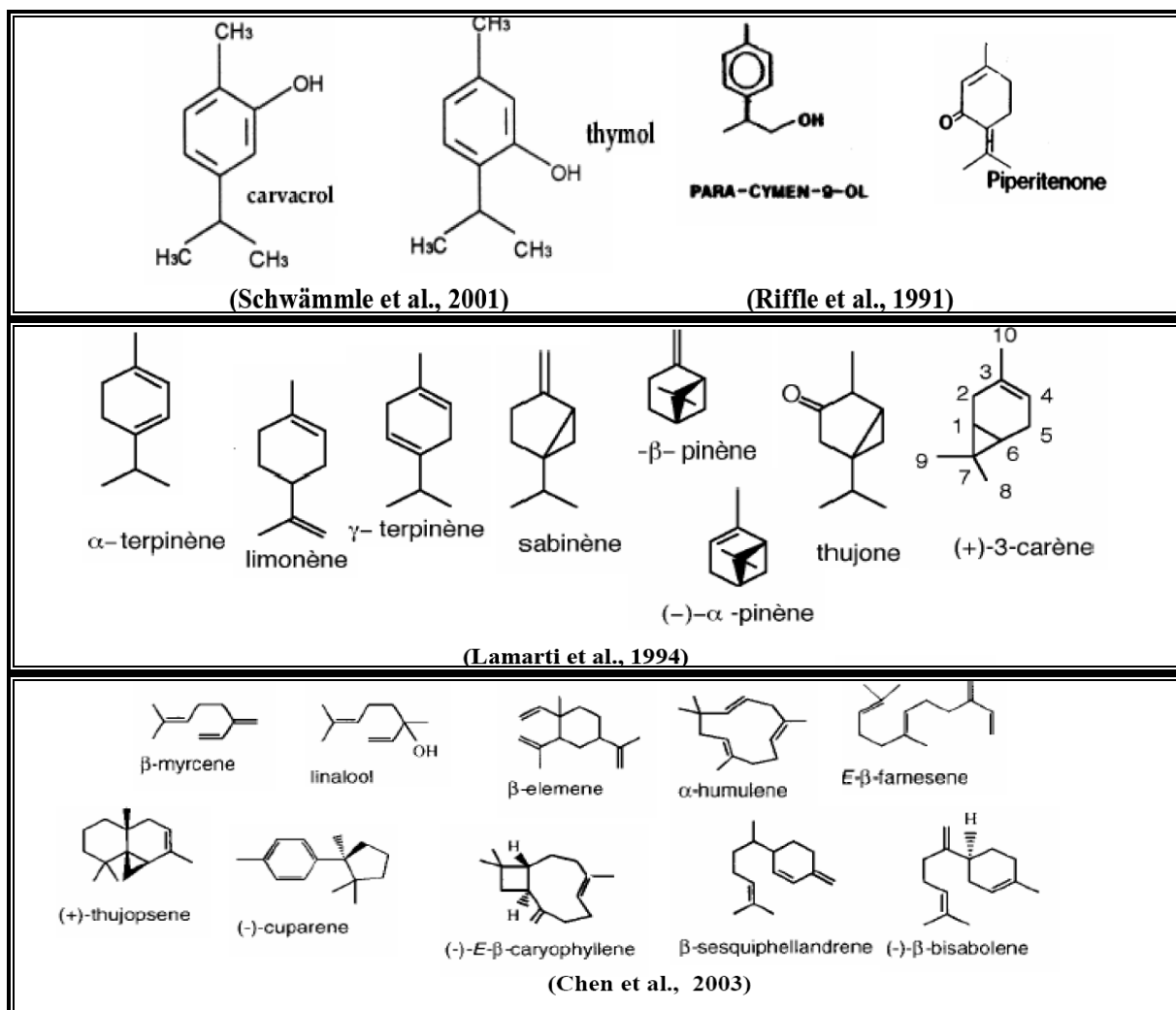


Figure 16 : Structure rencontrées dans les huiles essentielles.

II.3.4.3. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles

La différence de la composition constatée sur les huiles essentielles est vraisemblablement à mettre en rapport avec des facteurs abiotiques tels que le climat spécifique aux régions de provenance des échantillons, les facteurs géographiques comme l'altitude, la nature du sol (Brada *et al.*, 2007) et le choix de la période de récolte (Simonet *et al.*, 2006).

La méthode d'extraction est aussi un facteur qui influe considérablement la composition chimique des huiles essentielles. Ainsi lors de la distillation de ces dernières, des phénomènes sont à la base d'échanges de matière entre les phases solide, liquide et vapeur d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production.

Les expérimentations conduites jusqu'à épuisement du substrat en essence montrent que la durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées.

Cette différence est fortement liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des essences qui peuvent être superficielles ou internes. Elles ont une influence sur le déroulement de l'hydro-distillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu et par conséquent sur la durée (**Hadi, 2004**).

II.3.4.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général, le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composés (par exemple, les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées.

1. Distillation

Selon **Piochon (2008)**, il existe trois différents procédés utilisant le principe de la distillation : l'hydro-distillation, l'hydro-diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau.

➤ L'hydro-distillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et, de ce fait la plus anciennement utilisée. La matière végétale est immergée directement dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur, le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau surnage au dessus de l'hydrolat (**figure 17**). Cependant, l'hydro-distillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (**Lucchesi, 2005**).

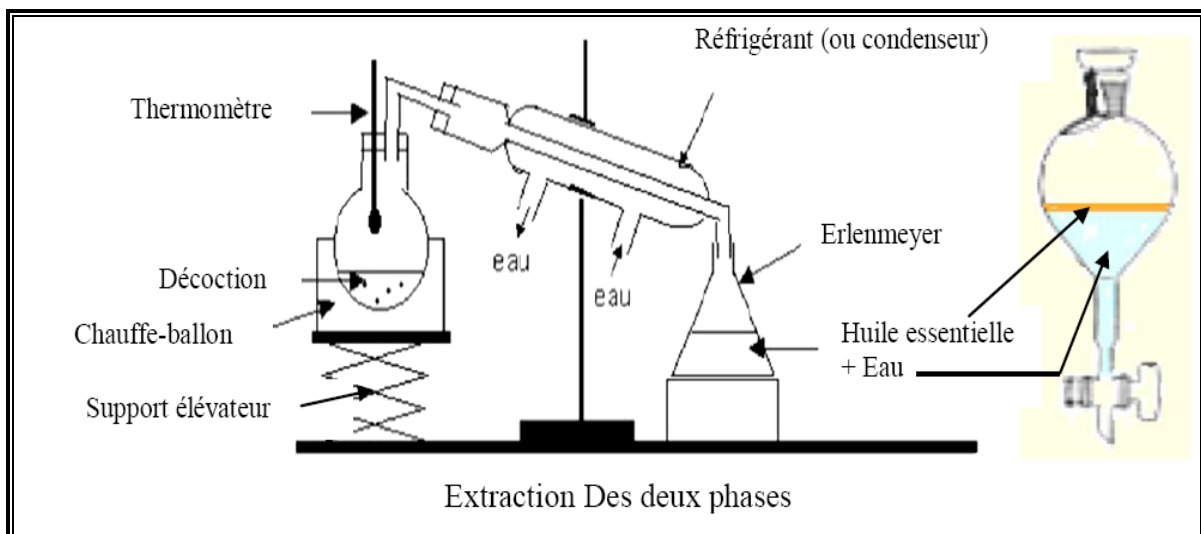


Figure : 17 schémas des étapes de l'hydro-distillation (**Lagunez Rivera ; 2006**).

➤ Distillation par entrainement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (**figure 18**). La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques.

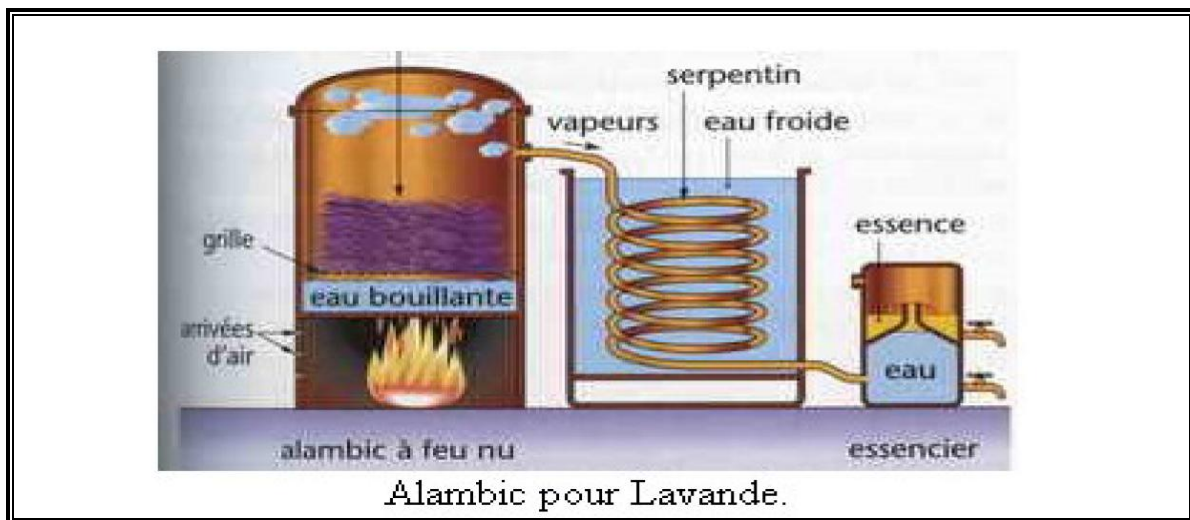


Figure 18 : Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entrainement à vapeur (Lucchesi, 2005).

➤ Hydro-diffusion

Cette technique est relativement récente. Elle consiste à faire passer du haut vers le bas et à pression réduite la vapeur d'eau au travers de la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide et donc moins dommageable pour les composés volatils.

2. Extraction à froid

Elle constitue le plus simple des procédés mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008).

3. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau

formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques à savoir condensation, refroidissement, et décantation. Des études démontrent que cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, l'utilisation de petites quantités de solvant et l'obtention d'un rendement d'extraction élevé (**Hemwimon et al., 2007**).

4. Extraction par les solvants et les graisses

Il s'agit d'extrait de plantes obtenu au moyen de solvants non aqueux (hexane, éther de pétrole etc.) mais aussi de graisses et d'huiles (absorption des composés volatils lipophiles par les corps gras). Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau, si bien que les extraits ne contiennent pas uniquement des composés volatils mais également un bon nombre de composés non volatils tels que des cires, des pigments et des acides gras. Un lavage à l'éthanol permet l'élimination de ces composés non désirables. Après distillation de l'alcool, le produit obtenu est appelé « absolu » et sa composition se rapproche de celle d'une huile essentielle. L'extraction à l'aide de solvants organiques pose des problèmes de toxicité et de solvants résiduels (**Hernandez-Ochoa, 2005**).

5. L'extraction au CO₂ supercritique

L'extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction (**figure 19**). En outre tous les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou l'isomérisation sont réduits au minimum du fait que le temps d'extraction y est réduit. Au-delà du point critique ($P = 73,8$ bars, $T = 31,1$ ° C), le CO₂ possède les propriétés intermédiaires entre celles des liquides et celles des gaz ce qui lui confère un bon pouvoir d'extraction (**Piochon, 2008**).

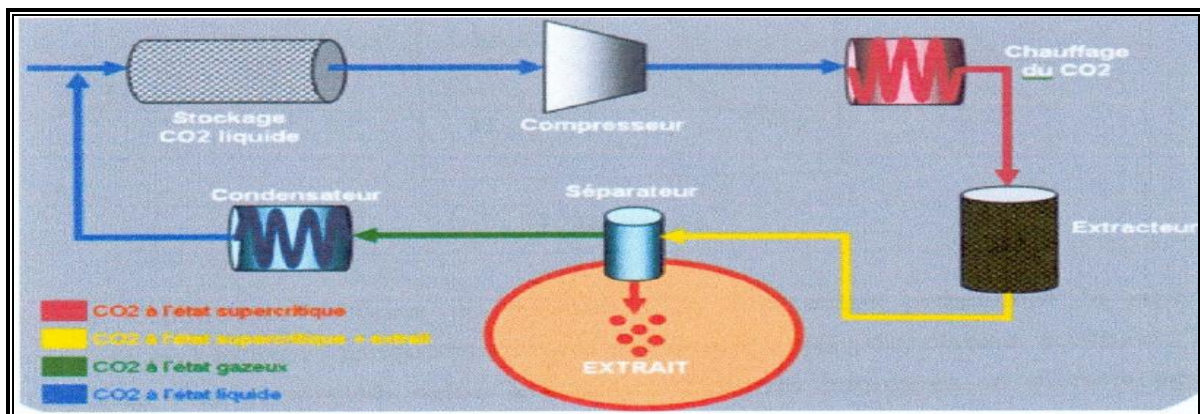


Figure : 19 Schéma du principe de la technique d'extraction par le CO₂ supercritique (**Pourmortazavi, 2007**).

II.3.4.5. La biosynthèse

Il ya deux groupes de composés contenus dans une huile essentielle : les hydrocarbures et les hydrocarbures oxygénés, le groupe le plus important est celui des terpénoïdes dérivant de la voie de mevalonate ou pyruvate via le précurseur isopentenyl pyrophosphate (IPP), et d'autres composés dérivant de la voie de shikimate (phénylpropanoïdes et dérivés) (Clarkf, 2008).

La synthèse des terpénoïdes est généralement associée à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface de tissus des plantes. Les principales structures cellulaires sont des cellules à essence (Lauracées, Zingibéracées..), des poils sécréteurs stipités (Pelargonium) ou sessiles (Labiées), des poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou schizolysigènes (Rutacées, Burséracées) soit enfin des canaux sécréteurs (Térébinthacées, Ombellifères) (Malecky, 2008).

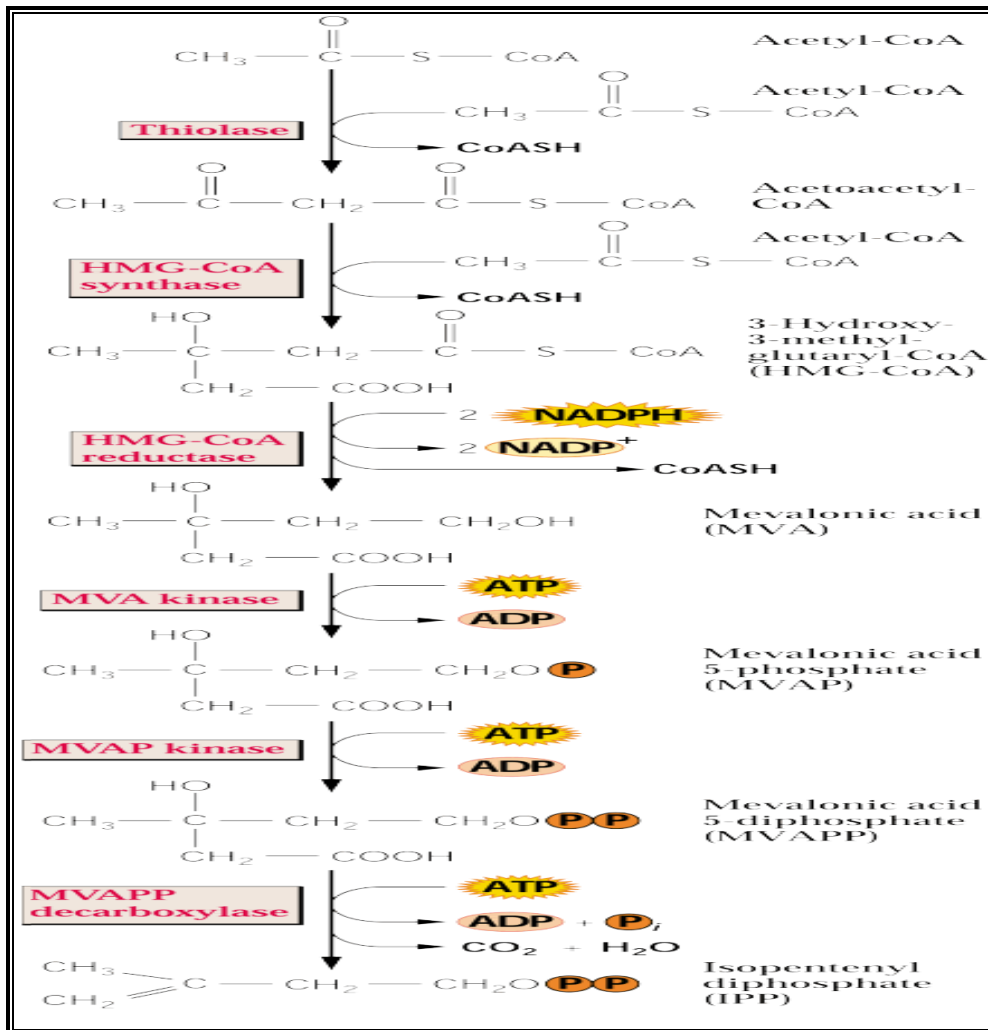
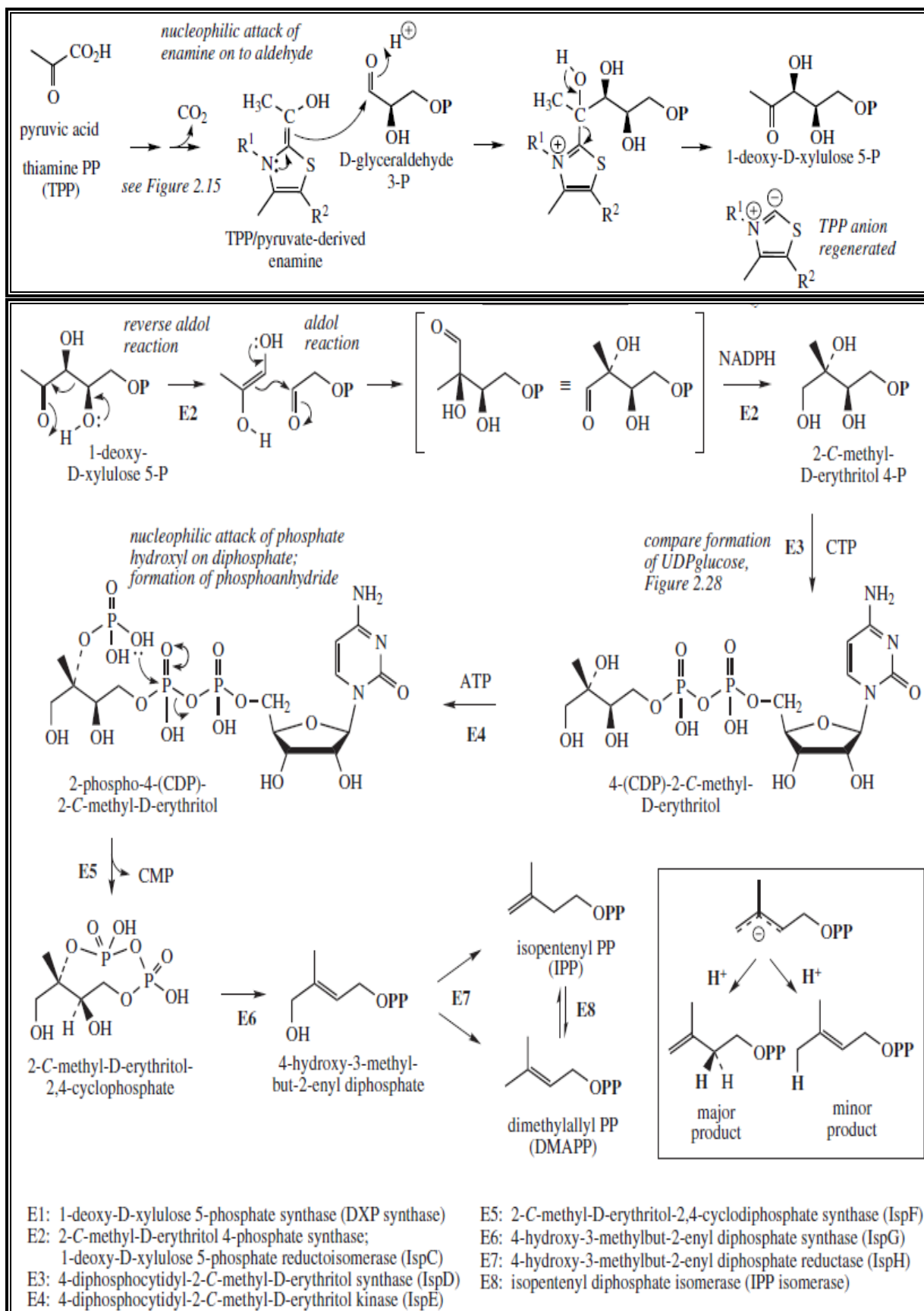


Figure 20 : Formation d'IPP par la voie de l'acide mévalonique (Dewick, 2002 ; Verpoorte et Alfermann, 2000 ; Bhat, Nagasampa et Sivakumar, 2005).



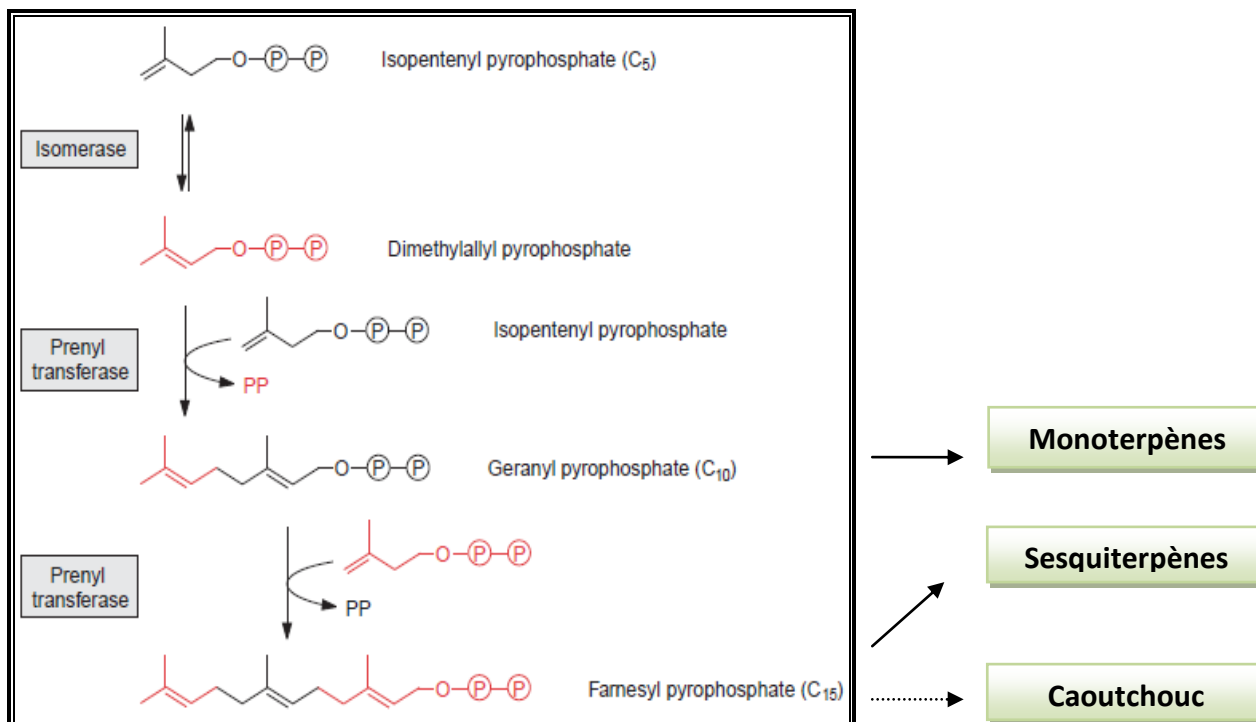


Figure 22 : Biosynthèse des terpènes à partir d'IPP (Malecky, 2008 ; Heldt, 2005).

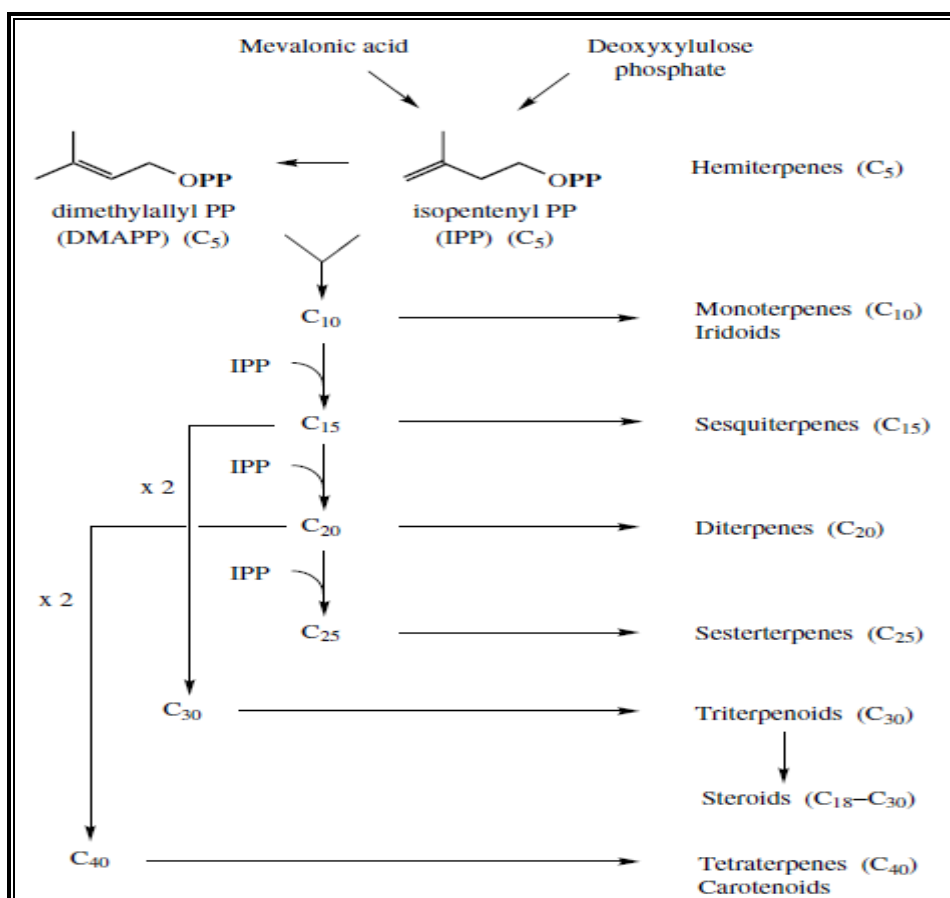


Figure 23 : Le passage entre les différents types de terpènes (Dewick, 2002).

II.3.4.6. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles

Depuis longtemps, les huiles essentielles sont utilisées en thérapeutique. Leurs applications dans ce domaine sont vastes. Elles requièrent de bonnes connaissances de ces substances et du fonctionnement du corps humain (**Soto-Mendivil et al ., 2006**). L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables (**Ouraini et al ., 2007**).

De nombreuses huiles essentielles se trouvent dans la formule d'un très grand nombre de produits pharmaceutiques : sirops, gouttes, gélules. Elles rentrent aussi dans la préparation d'infusions telles que la verveine, le thym, la menthe et autres. Elles ont une action anti-inflammatoire, antiseptique, désodorisante, insecticide et antioxydante (**Prabuseeninivasan et al ., 2006 ; Domaracky et al ., 2007**).

➤ **Activité antioxydante**

Les propriétés antioxydantes des huiles essentielles sont depuis peu massivement étudiées. Les huiles essentielles de cannelle, de muscade, de clou de girofle, d'origan et de thym possèdent de puissants composés antioxydants (**Edris, 2007**). Le thymol et le carvacrol sont les composés les plus actifs (**Bouhdid et al ., 2006**).

L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuée à certains alcools, éthers, cétones et aldéhydes monoterpéniques : le linalool, le 1,8-cinéole, le géraniol/nérol, le citronellal, et quelques monoterpènes : γ -terpinène et l' α -terpinolène (**Edris, 2007**).

Jukie et Milos (2005) ont montré dans une étude portant sur l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* que les chemotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) sont capables de réduire le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotypes phénoliques.

➤ **Activité anti-inflammatoire**

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires telles que les rhumatismes, les allergies ou l'arthrite (**Inouye, 2007**). Le potentiel thérapeutique très varié des huiles essentielles a attiré, ces dernières années, l'attention de chercheurs quant à leur possible activité contre le cancer. De ce fait, les huiles essentielles et leurs constituants volatils font dorénavant l'objet d'études dans la recherche de nouveaux produits naturels anticancéreux (**Edris, 2007**).

➤ **Activités antimicrobiennes**

Il est connu depuis l'antiquité que les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines comme la pharmacie, la cosmétologie, l'agro-alimentaire...etc., à la fin du XIX^e et au début du XX^e siècle, plusieurs travaux scientifiques relataient l'action antiseptique de plusieurs huiles essentielles (**Kaloustian et al., 2008**).

En phytothérapie, les huiles essentielles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne comme les bactéries endocanalaies ou la microflore vaginale et, d'origine fongique, comme les dermatophytes, les moisissures allergisantes ou les champignons opportunistes. Elles présentent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (**Billerbeck, 2007**).

Des études récentes ont prouvé que les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celle des moisissures et des levures et que leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique et, en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Bouaoun et al., 2007 ; Dorman et Deans, 2000 ; Oussala et al., 2006 ; Doughari et Obidah, 2008**).

III. Stress oxydant

III.1. Historique

Les radicaux libres, espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et les antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toute fois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, **R. Gerschman** puis **D. Hartman** évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En **1969**, les Américains **Mc Cord** et **Fridovich** isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

Il existe de nos jours un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques

associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires et la dégénérescence du système immunitaire (Guinebert, 2005).

III.2. Le stress Oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ceux qui sont responsables de leur contrôle et élimination (Sayre *et al.*, 2008 ; Bloomer *et al.*, 2008 ; Browne *et al.*, 2008 ; Power *et al.*, 2010). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008). L'équilibre ou homéostasie redox est perturbé et les cellules deviennent vulnérables aux attaques par les ERO (Mac Laren, 2007).

III.3. Les radicaux libres

Par définition, un radical libre est défini comme toute molécule ou atome possédant un ou plusieurs électrons non appariés, capables d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron libre sur sa couche externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique). Cela qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation (Finaud *et al.*, 2006b ; Mac Laren, 2007). Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelques nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe (exemple : $\cdot\text{OH}$) (Mac Laren, 2007 ; Sayre *et al.*, 2008 ; Goto *et al.*, 2008).

Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH), le monoxyde d'azote (NO), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Roberts *et al.*, 2010).

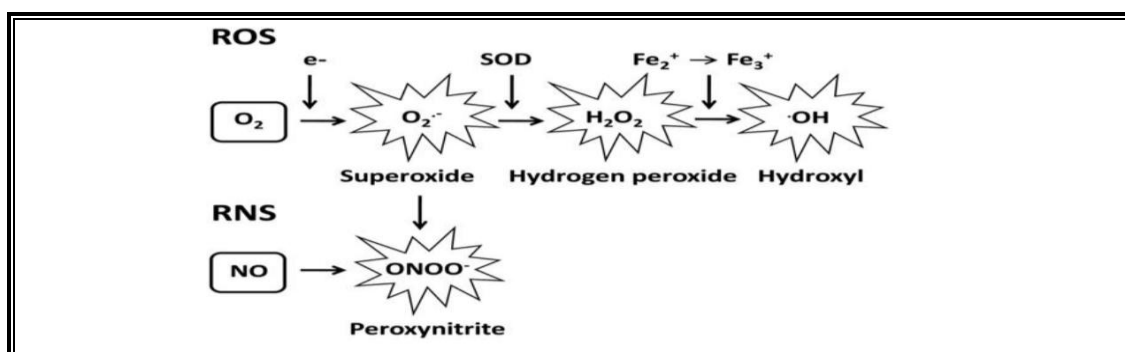


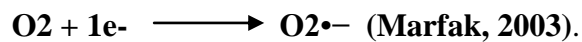
Figure 24 : Formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et nitrogène (ERN) (Codoner-Franch *et al.* , 2011).

III.4. Production des radicaux libres

On distingue deux types de production des radicaux libres :

III.4.1. Production endogène

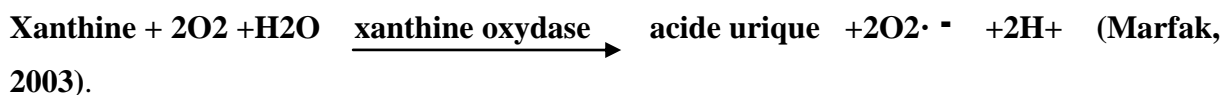
L'une des sources majeures des ROS est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire. Une telle réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial.



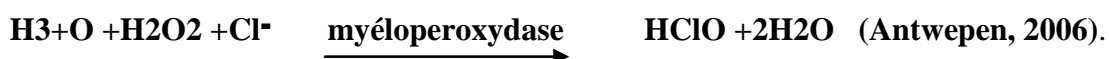
Autres chaînes du transport d'électrons (ex : peroxymes et microsomes) contribuent également à la production du $\text{O}_2^{\bullet -}$ dans la cellule aérobie. Les cytochromes P450 et b5 de la chaîne du transport d'électron des microsomes peuvent produire des ROS quand ils interrompent le cycle redox normal et détournent le flux d'électrons vers l' O_2 (Sevanian *et al*., 1990).

D'autre part les ROS peuvent se produire au cours des processus pathologiques ou la production du radical répond à une stimulation et intervient dans le processus inflammatoire (NADPH oxydase et xanthine oxydase) (Antwerpen, 2006).

Les cellules phagocytaires activées sont le siège d'un phénomène appelé "explosion oxydative", consistant en l'activation du complexe NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme lorsqu'il est contrôlé est capital dans la lutte infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers (Favier, 2003). D'ailleurs le système xanthine/xanthine oxydase permet aussi la production de l'anion superoxyde :



Une autre espèce réactive oxygénée produite au cours de l'inflammation est le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; en vue de réagir directement ou de produire l'acide hypochloreux par l'intervention de myéloperoxydase. Cette espèce (HClO) est caractérisée par un pouvoir oxydant nettement plus élevé que le H_2O_2 .



Le monoxyde d'azote est produit aussi par un système enzymatique NO synthétase (NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages (Favier, 2003).

D'autres systèmes sont capables de produire les ROS, citons par exemple : les réactions catalysées par les lipooxygénases et cyclooxygénases dans la voie de synthèse des leucotriènes, et prostaglandines (**Babior et al ., 2002**) ; les aldéhydes oxydases ou les protéines hémiques qui peuvent oxyder leur fer (I) en fer (III) avec production du radical $O_2\cdot$ (**Antwerpen, 2006**).

C'est ainsi l'auto-oxydation des monoamines (dopamine, épinéphrine, et norépinéphrine) ; et l'hémoglobine en présence de traces de métaux peut également être à l'origine de la production des ROS (**Gueye, 2007**).

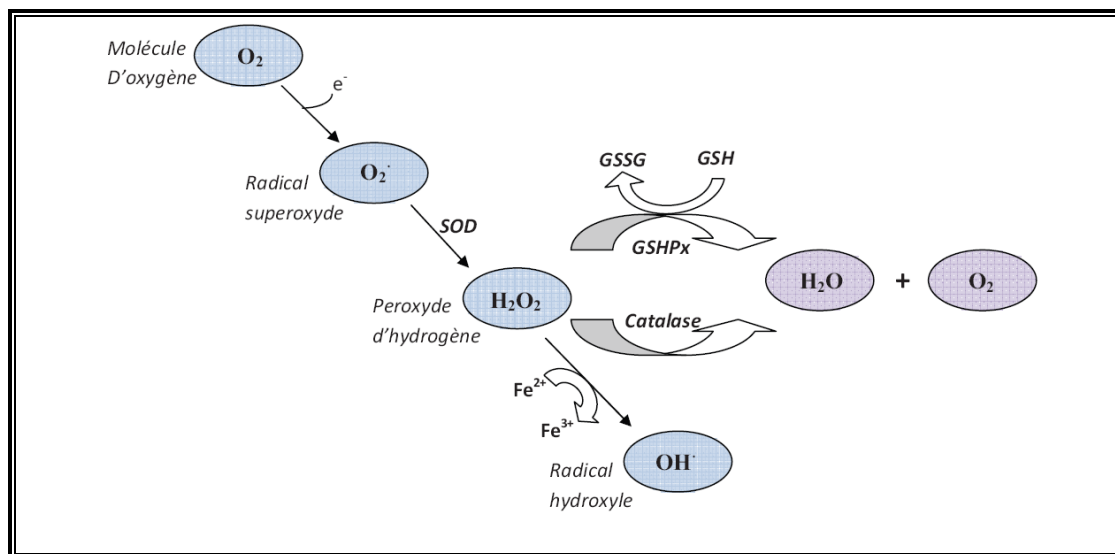


Figure25 : Principales étapes de production des espèces réactives de l'oxygène

III.4.2. Production exogène

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV (ultra-violet) induisent la synthèse de radicaux libres et de molécules génératrices de radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photo-sensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène (**Afonso et al ., 2007**).

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes (**Hadi, 2004**).

Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO_2), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels), sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires (**Hadi, 2004**).

La **figure 26** résume l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène, impliqué dans le stress oxydant.

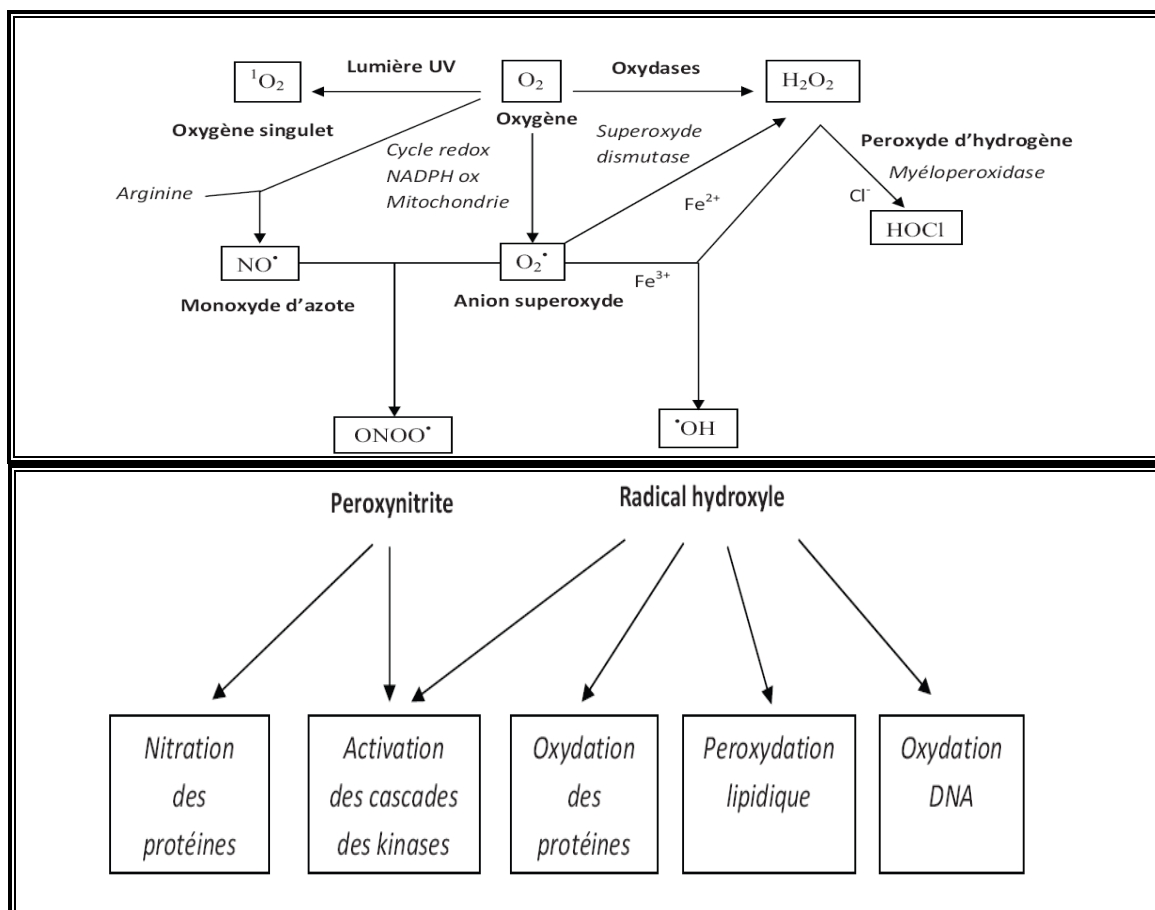


Figure 26 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l’oxygène

III.5. Les marqueurs biologiques de stress oxydant

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l’ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l’oxydation des lipides. La mise en évidence des dérivés de l’oxydation de ces différents substrats seront donc des marqueurs de la présence d’un stress oxydant (Cano, 2007).

Tableau 6 : exemple de produits dosés couramment pour rendre compte de l’oxydation d’une cible moléculaire donnée (Cano, 2007).

Cible	Produits	Exemples
Protéine	Protéines oxydées	Groupes carbonyle, tyrosine hydroxylée
ADN	ADN oxydé	8-hydroxy-2’ déoxyguanosine
Lipides	Lipide peroxydés	Malondialdéhyde (MDA), isoprostanes

III.6. Les maladies liées au stress oxydatif

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accéléré, Alzheimer, Parkinson, infections intestinales, rhumatisme, l'athérosclérose, le diabète (**Atawodi, 2005 ; Georgetti et al., 2003**).

III.7. Alimentation et stress oxydant

La production des ERO peut se faire au niveau cellulaire en réponse à divers stimuli, tel que la surcharge métabolique elle-même provoquée par une surabondance de macronutriments.

En effet, lorsque l'apport calorique dépasse la dépense énergétique, l'augmentation induite par le substrat en excès active le cycle de Krebs ce qui provoque la formation des ERO.

Ainsi, l'ingestion excessive de macronutriments induit la production des ERO (**Codoner-Franch et al., 2011**). Dans ce sens, une étude a démontré que l'ingestion de 75g de glucose induit une augmentation de la production de superoxyde dans les leucocytes, libérés ensuite dans le milieu extracellulaire (**Mohanty et al., 2000**). Une réponse similaire a également été observée suite à l'ingestion des graisses saturées (**Mohanty et al., 2000**). Une réponse similaire a également été observée suite à l'ingestion des graisses saturées (**Mohanty et al., 2002**). Ainsi, un repas riche en graisse et en glucides induit une réponse oxydatif et inflammatoire plus intense et prolongée avec une production accrue des ERO chez les patients obèses par rapport aux sujets normo-pondérés (**Patel et al., 2007**).

Pour cela, il est possible de choisir des aliments antioxydants et non inflammatoire à fin de minimiser l'inflammation et le stress oxydatif postprandial. L'avènement de la biologie moléculaire montre le rôle de certaine molécule de petite taille dans la défense antioxydante, en effet cette défense peut être renforcée par des apports exogènes.

Le schéma suivant montre qu'une bonne alimentation fourni directement l'essentiel des éléments pouvant assurer une bonne défense antioxydante. Cette alimentation garantie :

- ◆ Un apport en Vitamines A et C, les caroténoïdes et flavonoïdes qui ont pour rôle la neutralisation des entités radicalaires en les piégeant (Scavengers).
- ◆ Les oligoéléments tels que le Fer, Sélénium, Cuivre, Zinc et le Manganèse indispensables Pour l'activité des enzymes antioxydantes (Cu, Zn-SOD, Se-GPx).

Sur la base de ces données, les scientifiques accordent de plus en plus d'importance à une alimentation riche en fruits et légumes, cette constatation amène donc une réflexion importante sur l'effet d'une thérapie antioxydante à long terme dans le cadre de la prévention

de pathologies ou le stress oxydant est impliqué (ex : maladies cardiovasculaire). Dans cette optique l'étude SUVIMAX a proposé d'évaluer quel sera l'impact d'une prise journalière pendant 8 ans de d'un mélange d'antioxydants à des doses physiologiques (30mg de Vit E, 120 mg de Vit C, 6 mg de b-Carotène, 100µg de sélénium et 20 mg de Zinc sur l'incidence de l'apparition des maladies cardiovasculaires (**Pincemail et al., 2002**).

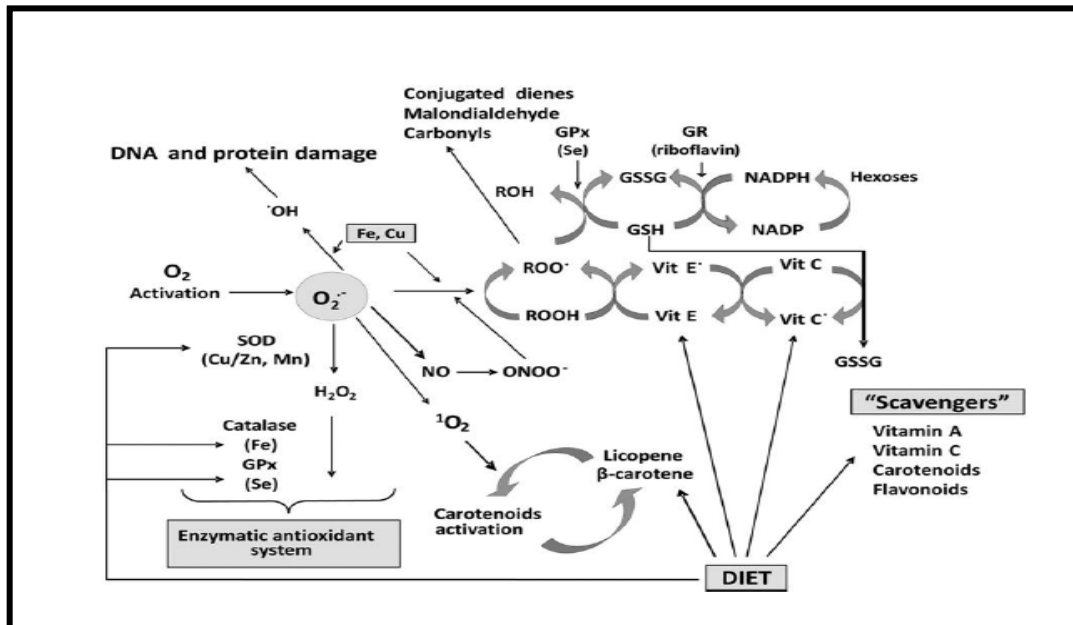


Figure 27 : Rôle de l'alimentation dans le métabolisme oxydatif (**Codoner-Franch et al., 2011**).

IV. Les antioxydants

Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement à faibles doses la production, de limiter la propagation ou de détruire les ERO (**Favier, 2003**).

Il est clair que tous les systèmes biologiques, dans leurs environnements oxygénés, ont élaboré des mécanismes pour contrer les conséquences potentiellement délétères des agents pro oxydants (**Rizzo et al., 2011**).

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule:

IV.1. Les antioxydants enzymatiques

L'un des systèmes de défense antioxydants enzymatiques est constitué de trois enzymes : le superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase GSH-Px et la catalase. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (**Lehucher-Michel et al., 2001**).

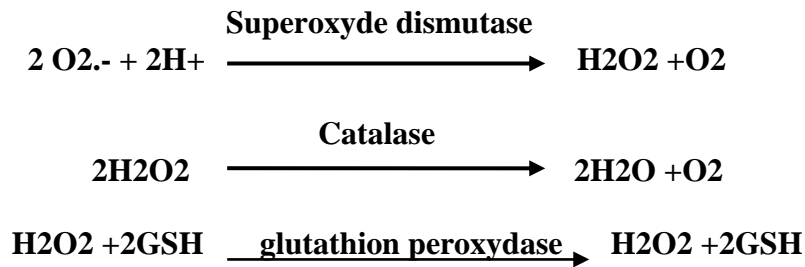


Figure 28 : Réactions enzymatiques de piégeage des espèces réactives oxygénées ERO
(Halliwell, 2006)

Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, le glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases. La plupart de ces enzymes, de même que les enzymes de réparation des dommages oxydants, vont utiliser un donneur d'équivalent réducteur, le NADPH, qui constitue avec le glutathion les plaques tournantes de la défense antioxydante (Favier, 2003).

IV.2. Antioxydants non enzymatiques

Ce groupe d'antioxydants est constitué de plusieurs composés capables de réagir directement ou indirectement avec les ERO. Le mécanisme indirect implique la chélation des métaux de transition ce qui empêche la production du radical hydroxyle, hautement toxique (Kohen et Nyska, 2002).

Certains composés antioxydants comme les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables. La vitamine piègeuse va devenir un radical, puis sera soit détruite, soit régénérée par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur « scavenger » pour les Anglo-saxons. De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes Il existe de plus des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO• (Favier, 2003 ; Flora, 2009).

IV. 3. Antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi lesquels se trouvent le β-carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux

hydroxyles $\cdot\text{OH}$ et peroxydes $\text{RO}_2\cdot$. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidique, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

IV.4. Les antioxydants synthétiques

Il s'agit du butylhydroxytoluène (BHT), du butylhydroxyanisole (BHA) et des esters de l'acide gallique : gallate de propyle, gallate doctyle, et de dodécyle. Le BHT est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Le BHA est un mélange de deux isomères de position dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT.

Il existe d'autres antioxydants synthétiques peu utilisés tels que la TBHQ (tertiobutylhydroquinone) utilisée pour la conservation des huiles brutes, l'acide nordihydrogualarétique (NDGA), ce dernier est utilisé dans les produits à usage topique et le 4-hydroxyméthyl 2,6-ditertiobutylphénol ou Ionox 100, dont les propriétés antioxydantes sont voisines de celles du BHT (figure 29) (Johnson, 1988).

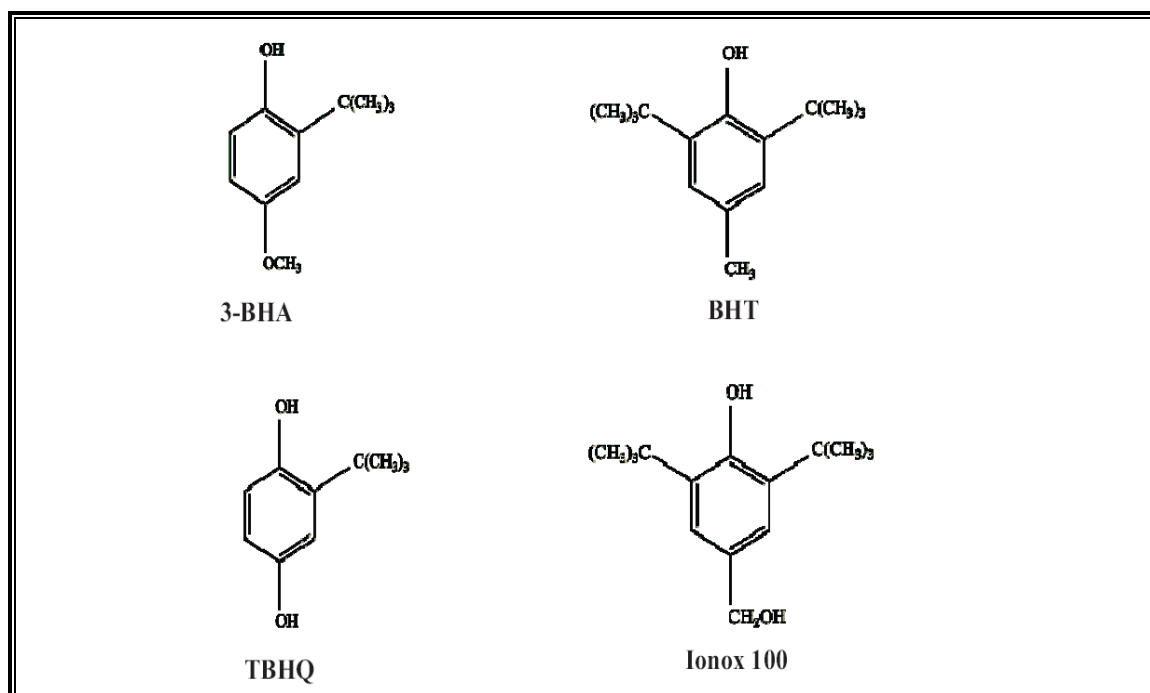


Figure 29: Structure chimique de quelques antioxydants synthétiques.

V. Evaluation in vitro de l'activité antioxydante

V.1. Introduction

Actuellement, une grande diversité des méthodes analytiques pour la détermination de la capacité antioxydante est disponible. Ces analyses diffèrent entre eux en terme de mécanismes de réaction, oxydants et espèces cibles (les sondes), états des réactions et la

forme dont sont exprimés les résultats. En plus, même lorsque seulement une de ces analyses est envisagée, ça engendre d'autres paramètres à prendre en considération tels que : le solvant, le temps de réaction et le pH (**Magalhaes et al., 2008**).

Une batterie d'analyses mesurant différents aspects du comportement des antioxydants est recommandée pour produire un profil antioxydant complet.

La comparaison des données de différentes études est difficile. Il est également d'une grande importance de choisir des méthodes acceptées, validées et normalisées, avec des données, à la fois, comparables et disponibles dans la littérature.

La conception de telles méthodes se fonde sur l'utilisation des espèces oxydantes et les sondes (protéines, triacylglycérols, et modèles de cellules) avec la signification biologique appropriée que la réaction conditionne (concentration, temps de réaction, pH ...), liée étroitement à ce qui peut être *in vivo* (**Magalhaes et al., 2008**).

V.2. Méthodes de piégeage des radicaux libres oxygénés

V.2.1. Piégeage du radical peroxyde (ROO●)

La mesure de l'ORAC (Oxygen-Radical Absorbance Capacity) développée par **Cao et al., 1993** est une méthode simple et reproductible permettant d'évaluer la capacité antioxydante de différentes molécules (**Benderitter et al., 2003**). La β -PE (Porphyridium cruentum β Phycoerythrin ou Phycoérythrine) est une protéine fluorescente extrêmement sensible au stress oxydatif. En présence d'AAPH [(2,2'-azobis(2-amidinopropane)dichloride)], un donneur du radical peroxyde, la structure tétramérique de la β -PE est modifiée, elle se dimérise. Cette dimérisation dépendante de la concentration en radicaux peroxydes du milieu réactionnel peut être suivie en mesurant la décroissance de la fluorescence de la β -PE en fonction du temps. Cette cinétique de décroissance de la fluorescence est directement reliée à la concentration de radicaux libres présents dans le volume réactionnel dans ces conditions définies de temps et de concentrations de la β -PE est d'AAPH.

V.2.2. Piégeage du radical superoxyde (O₂⁻)

Cet essai évalue la capacité d'un produit à capturer un radical libre, l'anion superoxyde O₂⁻. Ce radical est généré *in vitro* par le système hypoxanthine/xanthine oxydase.

Dans cette méthode, le radical réduit le NBT₂⁺ (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm.

Ainsi un composé antioxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du NBT₂⁺ par rapport à un

témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé anti-oxydant. On peut ensuite tracer une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en composé testé, et déterminer la CI50 (concentration inhibant 50% de l'activité) du composé (**Parejo et al., 2002**).

V.2.3. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ scavenging activity)

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H₂O₂ diminue par les composés piègeurs la valeur d'absorbance de ce dernier à 230nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (**Malgalhaes et al., 2008**).

V.2.4. Analyse de la capacité de piégeage du radical hydroxyle (HO•)

En raison de la réactivité élevée des radicaux hydroxyles, presque toutes les molécules dans les systèmes biologiques peuvent être considérées comme des piègeurs du radical HO•.

Ainsi, l'évaluation du piégeage direct de HO• peut être non pertinente pour l'évaluation de l'action antioxydante d'un composé, simplement parce que des concentrations très élevées du piègeur sont exigées pour concurrencer les molécules adjacentes *in vivo*.

Plusieurs méthodologies *in vitro* pour la détermination de la capacité du piégeage du HO• sont disponibles dans la littérature, la plupart du temps basé sur l'ensemble Fe³⁺ + EDTA + H₂O₂ + système d'acide ascorbique, pour produire un flux constant de HO•.

Ces radicaux attaquent le désoxyribose en position 2 (utilisé comme cible), le dégradant en une série de fragments, certains réagissent lors du chauffage avec de l'acide thiobarbiturique à un pH faible pour donner un chromogène rose (**Halliwell et al., 1987**).

Si un antioxydant est ajouté au mélange de la réaction, il concurrencera avec le désoxyribose le radical HO•, empêchant ainsi la dégradation des espèces cibles (**Hagerman et al., 1998**).

V.2.5. Analyse de la capacité de piégeage d'acide hypochloreux (HOCl)

L'acide hypochloreux est obtenu à partir du système enzymatique myéloperoxydase/ H₂O₂/Cl⁻ ou en acidifiant l'hypochlorite de sodium commercial à pH 6.2 avec de l'acide sulfurique (**Aruoma, 1997**). L'analyse de l'élastase, mesure la capacité d'un composé à protéger l' α -1-antiprotéinase (α -1-AP) contre l'inactivation par HOCl (**Haenen et Bast, 1991**). L'activité d'élastase est plus tard mesurée en utilisant un substrat d'élastase (ester de p-nitrophénol de N-t-BOC-L-alanine), l'absorbance est mesurée à 410 nm (**Halliwell et al., 1995**).

V.2.6. Analyse de la capacité de piégeage de l'oxygène singulet (1O₂)

En raison de son affaiblissement de l'état fondamental d'énergie inférieure, 1O₂ émet la phosphorescence caractéristique à 1270 nm. Par conséquent, la capacité du piégeage du 1O₂ de plusieurs composés est mesurée par les taux d'affaiblissement de l'intensité de la lumière (Wilkinson et Helman, 1995).

V.2.7. Analyse de la capacité du piégeage d'oxyde nitrique (NON•)

Vriesman et ses collaborateurs (1997), ont développé une méthode relativement simple pour la quantification de la capacité de piégeage des composés contenant du soufre dans le soluté utilisant un NON•. L'oxyde nitrique est ajouté aux solutions tampon du composé piègeur (glutathion, bisulfure de glutathion, glutathion S-méthylque, cystéine N-acétyle, acide lipoïque et acide dihydrolipoïque) et sa concentration est suivie en fonction du temps. La limitation principale de cette méthode, consiste en sa longue durée et que la technique n'est pas facilement disponible (Perez *et al.*, 2007).

V.3. Méthodes de piégeage des radicaux stables et évaluation de leur capacité de réduction

V.3.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

Dans cette analyse, le DPPH• de couleur pourpre est réduit par les molécules dites antioxydantes en hydrazine jaune pâle. La capacité de piégeage est généralement évaluée dans des milieux organiques en surveillant la diminution de l'absorbance à 515-528 nm jusqu'à ce que l'absorbance demeure constante (Brand-Williams *et al.*, 1995).

La détermination de la capacité antioxydante est basée sur la réduction ampérométrique du DPPH• au carbone vitreux. Le courant qui en résulte sur une électrode vitreuse de carbone polarisée au potentiel fixe, est proportionnel à la concentration résiduelle de DPPH• après la réaction avec les antioxydants (Milardovic *et al.*, 2006).

En opposition à ce qui a été toujours crue, le mécanisme de réaction est basé sur une réaction de transfert d'électron, tandis que l'abstraction d'atome d'hydrogène est un processus réactionnel marginal, parce qu'elle se produit lentement dans des solvants forts, tels que le méthanol et l'éthanol (Foti *et al.*, 2004).

L'accessibilité stérique de DPPH• est une cause déterminante de la réaction, puisque les petites molécules qui ont un meilleur accès à l'emplacement du radical ont sans doute une capacité antioxydante relativement plus élevée (Huang *et al.*, 2005). D'une part, beaucoup de composés antioxydants de taille moléculaire élevée qui réagissent rapidement avec les radicaux peuvent réagir lentement ou peuvent même être inertes dans cette analyse.

L'inexistence de DPPH• ou des radicaux semblables dans les systèmes biologiques est également un point faible.

V.3.2. Puissance antioxydante de réduction du fer (analyse FRAP)

L'analyse FRAP mesure la capacité des antioxydants à ramener le complexe ferrique de la tripyridyl-s-triazine 2.4.6 [Fe (III) - (TPTZ) 2]3+ intensément au complexe ferreux coloré par le bleu [Fe (II) - (TPTZ) 2]2+ dans un milieu acide (**Benzie et Strain, 1999**). Les valeurs sont calculées en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 593 nm et en la rapportant à une solution étalon d'ions ferreux ou à une solution étalon d'antioxydants (**Tsao et al., 2003**).

Un point à prendre en compte est la production concomitante de Fe (II), qui est un prooxydant bien connu, et peut avoir comme conséquence la génération des radicaux additionnels dans le milieu de réaction. En plus, les composés qui absorbent à la même longueur d'onde peuvent s'y mêler, entraînant une surestimation des résultats (**Ou et al., 2002**).

V.3.3. Analyse par le réactif Folin-Ciocalteu (FC)

La chimie derrière l'analyse FC se fonde sur le transfert des électrons dans un milieu alcalin à partir des composés phénoliques et de toutes autres espèces réductrices au molybdène, formant des complexes bleus qui peuvent être détectés par spectrophotométrie à 750-765 nm (**Singleton et al., 1999**).

Par conséquent, ce n'est que récemment que l'analyse de FC est proposée pour mesurer la capacité réductrice totale des échantillons (**Huang et al., 2005**). D'excellentes corrélations linéaires entre l'analyse de FC avec d'autres analyses (TEAC et DPPH•, par exemple) ont été établies (**Roginsky et Lissi, 2005**).

V.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (*β-carotene bleaching method*)

Cette technique consiste à mesurer à 470 nm, la décoloration du bêta-carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique.

La dispersion de l'acide linoléique et du bêta-carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50°C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de la décoloration du bêta-carotène (**Koleva et al., 2001**).

Cette méthode est, d'autre part, sujette au parasitage de composés absorbants dans la fenêtre spectrale du bêta-carotène et l'interprétation des données n'est pas aisée car le bêta-carotène est lui-même un antioxydant (**Laguerre et al., 2007**).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

I. Introduction

Les plantes aromatiques constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (**Mailhebiau, 1994**).

L'Algérie, par sa situation géographique, offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. .

A cet effet, on s'est intéressé à l'une des espèces de la famille des Lamiacées : le thym (*Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et *Thymus ciliatus* ssp *euciliatus*) et, il est important de définir leurs identités, connaître leurs compositions chimiques et rechercher leurs activités biologiques.

II. Matériel végétal

Le *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* a été cueilli à son âge mature au mois de mai dans la région de « Béni-Mester » et, la ssp *euciliatus* a été récolté dans son habitat naturel à savoir la région « d'Ain Fezza » durant le mois de juillet. Les deux zones d'études sont situées dans la wilaya de Tlemcen (ouest algérien).

Les deux plantes ont été identifiées par les botanistes du laboratoire d'Ecologie et de Gestion des Ecosystèmes Naturels de l'université de Tlemcen.

Le matériel végétal ainsi récolté a été trié, séché à l'air libre et à l'obscurité pendant une quinzaine de jours. Une fois séchées, les racines et la partie aérienne ont été concassées séparément dans un mortier traditionnel, pulvérisées au broyeur puis soumises aux tests phytochimiques et à différentes extractions.

Les figure 30 et 31, représente les stations de récolte de deux ssp étudié Ain Fezza et Beni Mester




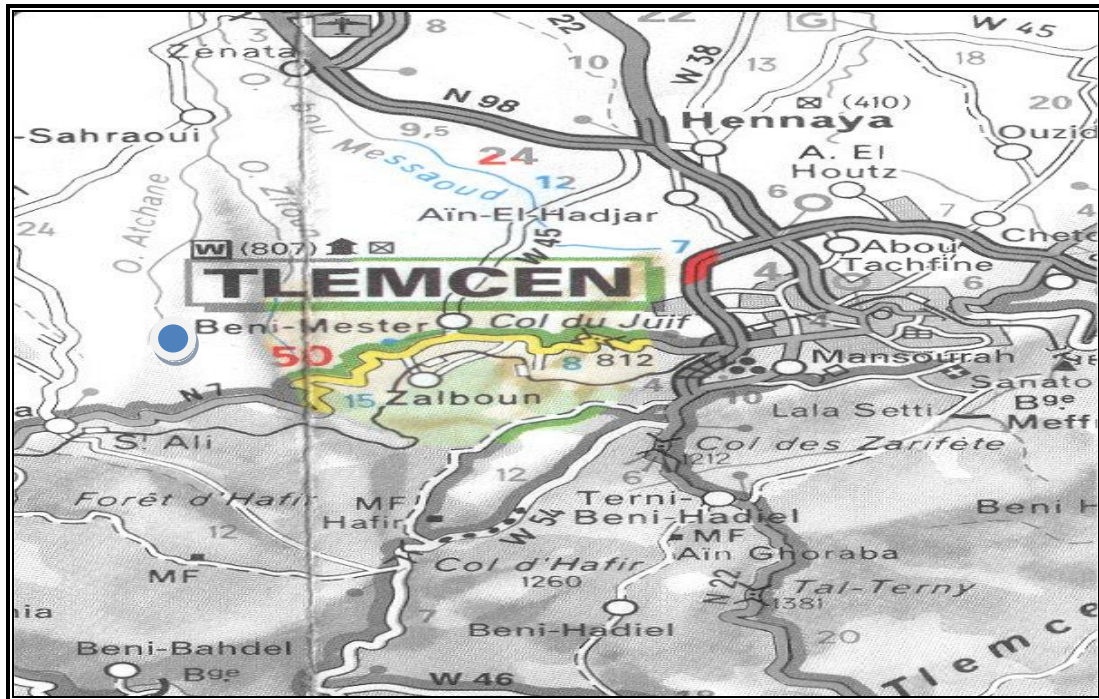
 Station de récolte pour la ssp *euciliatus*

Figure 30 : Carte géographique de la station de récolte Ain Fezza – Tlemcen, Algérie




 Station de récolte pour la ssp *coloratus*

Figure 31 : Carte géographique de la station de récolte Beni Mester – Tlemcen, Algérie

III. Tests phytochimiques

Dans le cadre de la recherche de ces molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est préférable de déterminer leurs compositions chimiques par une étude phytochimique afin de détecter les classes des composés existants dans les différents organes des plantes.

Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, sur des réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette.

III.1. Différentes classes recherchées

III.1.1. Les tannins

La présence des tannins est mise en évidence en ajoutant à 1ml de l'extrait éthanolique, 2ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleue-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleue-verte celle des tannins cathéchiques (**Trease et Evans, 1987**).

III.1.2. Les flavonoïdes

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait éthanolique avec 1ml de HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (**Cavé, 1993**).

III.1.3. Les anthocyanes

Un volume de 2ml d'infusé aqueux est additionné à 2ml de HCl 2N. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu-violacé par addition d'ammoniac indique la présence d'anthocyanes (**Debray et al., 1971 ; Paris et al., 1969**).

III.1.4. Les coumarines

Une masse de 1gramme de poudre végétale est placée dans un tube en présence de quelques gouttes d'eau distillée. Les tubes sont recouverts avec du papier imbibé de NaOH dilué et sont portés à ébullition. Toute fluorescence jaune témoigne de la présence de coumarines après examen sous ultra-violet (**Rizk, 1982**).

III.1.5. Les alcaloïdes

Nous avons procédé à une macération de 24 heures de 2grammes de poudre végétale mélangés à 50ml de H_2SO_4 dilué au demi et à de l'eau distillée. Nous avons filtré le mélange et rincé à l'eau de manière à obtenir 50ml de filtrat. Ensuite nous avons pris deux tubes à essai dans lesquels nous avons introduit 1ml du macéra. Nous avons ajouté dans le tube n° 1, 5 gouttes de réactif de Mayer et dans le tube n° 2, 5 gouttes de réactif de Wagner.

La présence d'une turbidité ou d'un précipité, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes (**Paris et al., 1969**).

III.1.6. Stérols et triterpènes

Deux essais ont été effectués :

► **Essai 1** : Test pour les stérols et stéroïdes :

Un volume de 10 ml de l'extrait éthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu est solubilisé avec 10 ml de chloroforme anhydre. Ensuite, on mélange 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C) (**Trease et Evans, 1987**).

► **Essai 2** : Test pour les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques :

Il consiste à évaporer à sec l'extrait éthanolique correspondant à 10 ml. Ensuite, on dissout le résidu obtenu dans un mélange d'anhydre acétique/ chloroforme (5/5 : V/V) ; puis on filtre et on traite le filtrat par quelques gouttes d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann-Burchardt).

Si cette réaction donne des colorations verte-bleue et verte-violette, elle indique alors la présence respective des hétérosides stéroïdiques et triterpéniques (**Trease et Evans, 1987**).

III.1.7. Les saponosides

Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Nous avons procédé à une décoction de 2 grammes de poudre végétale avec 100 ml d'eau distillée qu'on porte à ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100ml. A partir de cette solution mère, on prépare 10 tubes (1,3cm de diamètre interne) avec 1,2, ... 10ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes.

Après un repos de 15 minutes en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en centimètre. Si elle est proche de 1 cm dans le 10^{ème} tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{Hauteur de mousse (en cm) dans le 10}^{\text{ème}} \text{ tube} \times 5 / 0,0 X$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100 (**Dohou et al., 2003**).

III.1.8. Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec de l'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer.

Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

III.1.9. L'amidon

On Chauffe 5 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'une solution de NaOH saturée dans un bain marie jusqu'à l'ébullition. Ajouter ensuite le réactif d'amidon.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-violacé (**Bruneton, 1999**).

IV. Extraction des composés phénoliques

Les extractions sélectives des principales familles des composés phénoliques ont été effectuées sur les deux parties (racines et parties aériennes) des deux plantes étudiées la ssp coloratus et la ssp euciliatus selon les méthodes suivantes.

IV. 1. Préparation des extraits bruts méthanoliques

La poudre (1 gramme) de chaque partie (racine et partie aérienne) pour les deux plantes est placée dans un erlenemeyer contenant 20 ml de méthanol pendant 24 heures. Après la filtration, les solutions méthanoliques sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type Büchi R-200 à 60°C. Les résidus secs pesés sont repris par 3 ml de méthanol.

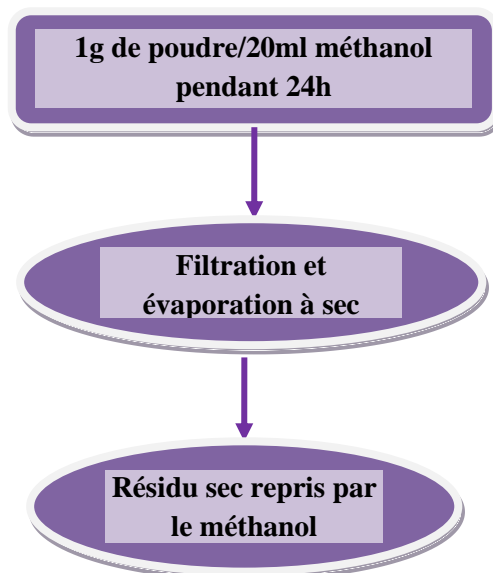


Figure 32: Protocole d'extraction des extraits bruts.

IV.2. Extraction des flavonoïdes

Les extractions des flavonoïdes de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus* sont réalisées par la méthode décrite par **Bekkara et al., 1998** « fractions d'acétate d'éthyle et butanolique ».

Une masse de 1 gramme de poudre (racine, partie aérienne) est mise en contact avec 20 millilitres de méthanol pendant 24 heures. L'extrait méthanolique récupéré est ensuite évaporé à sec ($T=60^{\circ}\text{C}$) à l'aide d'un rotavapeur type Buchi R-200. Le résidu sec obtenu est partagé entre 10 millilitres d'acétate d'éthyle et 10 millilitres d'eau distillée chaude dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle est récupérée puis séchée par un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris par 3 ml de méthanol. La phase aqueuse issue de l'extraction avec l'acétate d'éthyle est partagée avec 10 millilitres du 1-butanol. La phase butanolique est séchée au rotavapeur à 60°C . Le résidu sec pesé, est repris par 3 millilitres de méthanol (**Figure 33**).

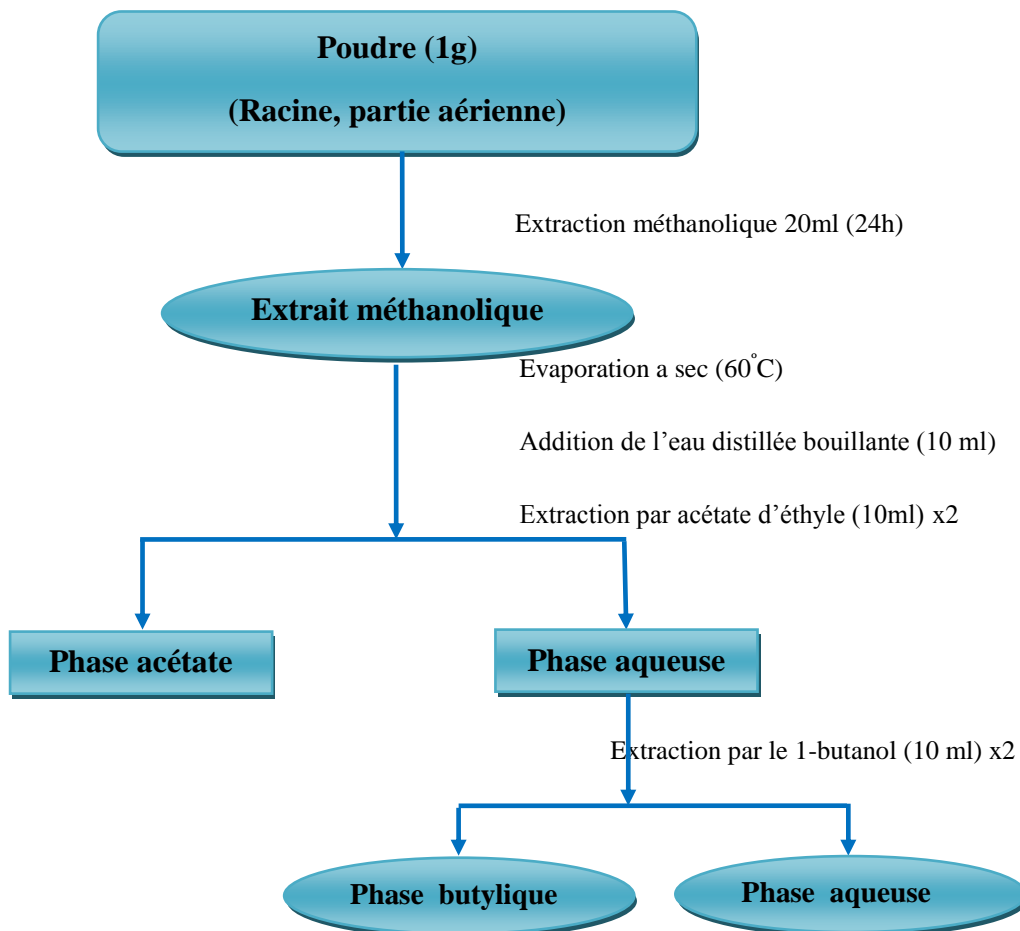


Figure 33: Schéma d'extraction des flavonoïdes (**Bekkara et al., 1998**).

IV.3. Extraction des tannins

L'extraction des tannins est obtenue en suivant la méthode de **Zhang *et al* (2008)**. Le broyat (racine, partie aérienne) correspondant à 2,5 grammes est extrait par 50 millilitres du mélange acétone/eau distillée (35/15 ; V/V) durant trois jours à la température ambiante. La solution est filtrée et évaporée à 40 °C à l'aide d'un rota-vapeur type Buchi R-200 pour éliminer l'acétone. Puis, la phase aqueuse est lavée par 15ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides.

Après la séparation de la phase organique, la phase aqueuse est extraite deux fois avec 15 millilitres d'acétate d'éthyle. La phase organique ainsi obtenue est évaporée à sec à 40 °C puis pesée et reprise par 3 millilitres de méthanol.

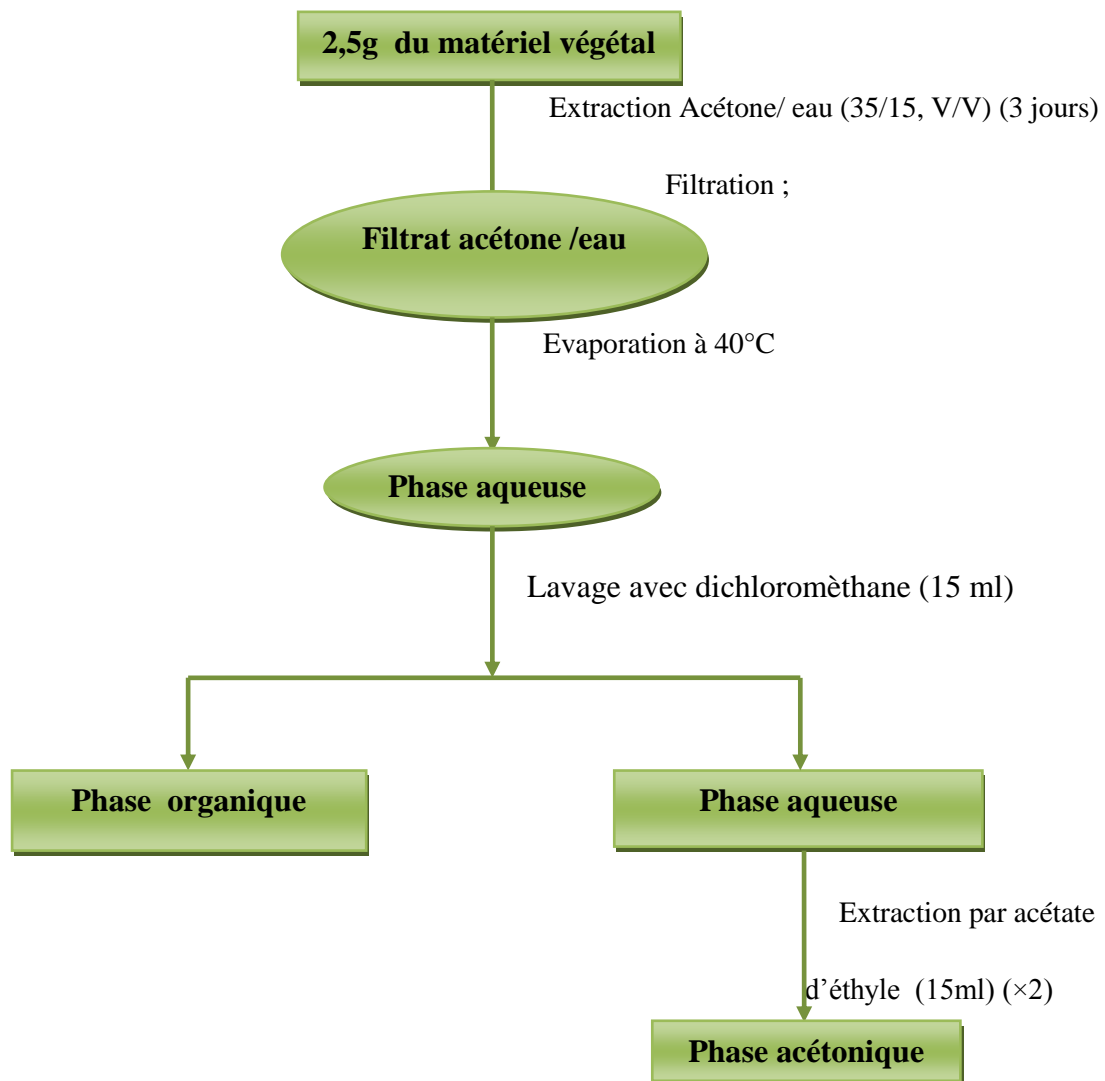


Figure 34: Protocole d'extraction des tanins.

IV.4. Calcul des rendements en extraits secs

Nous pouvons déterminer le rendement de différentes parties pour les deux plantes en extraits secs en calculant le rapport suivant :

$$\text{Rdt \%} = \left[\frac{P_1 - P_2}{P_3} \right] \times 100$$

♦**P₁** : poids du ballon après évaporation ;

♦**P₂** : poids du ballon avant évaporation ;

♦**P₃** : poids de la matière végétale de départ.

IV.5. Extraction des huiles essentielle

Il existe plusieurs méthodes d'obtention des huiles essentielles à savoir l'entraînement à la vapeur, l'hydro-distillation...etc. Dans notre cas, nous avons utilisé la technique d'hydro-distillation, c'est une technique d'extraction dans laquelle le solvant est l'eau. Elle peut être utilisée pour extraire des espèces insolubles dans l'eau.

➤ Principe de l'hydro-distillation

Son principe est le suivant :

- La substance contenant l'espèce volatile à extraire est mélangée avec de l'eau et l'ensemble est porté à l'ébullition.
- La phase gazeuse, contenant l'espèce volatile et la vapeur d'eau, arrive en haut de la colonne, passe dans le réfrigérant ensuite elle se condense.
- Le résultat de l'hydro-distillation est le distillat. Ce dernier comporte alors deux phases liquides, qu'on peut séparer par décantation (**Bagard, 2008**).

➤ Technique

La méthode d'extraction est décrite ci-dessous :

On place la matière végétale sèche : 200 g dans 2 litres d'eau distillée en utilisant un appareil de type Clevenger selon la méthode préconisée dans la Pharmacopée européenne (**Council of Europe, 1996**), puis on chauffe l'ensemble pendant 4 heures, après on récupère les vapeurs refroidies. Enfin, les huiles essentielles sont récupérées dans des flacons de verre scellés puis conservées au réfrigérateur à 4°C. Le montage de l'hydro-distillation est représenté ci-dessous.

❖ Calcul de rendement

On appelle rendement le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la plante à traiter. Le rendement en pourcentage (R) est calculé par la formule suivante :

$$R = \text{PH} / \text{PP} \times 100$$

Où

♦**PH** : poids de l'huile essentielle extraite en g ;

♦**PP** : poids de la plante traitée en g.



Photo01: Montage de la technique d'extraction par hydro-distillation.

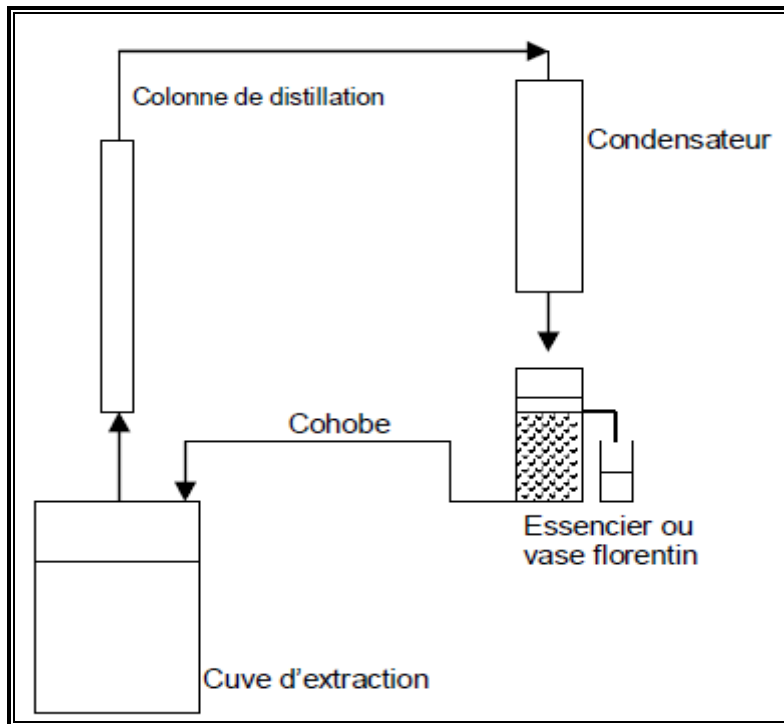


Figure 35 : Schéma du montage utilisé pour l'hydro-distillation.

V. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

Ces analyses sont faites en conformité aux normes A.F.N.O.R (1994). Nous avons déterminé quelques caractères physiques à savoir la densité, l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, la solubilité dans l'alcool et le point de congélation et deux indices chimiques en l'occurrence l'indice d'acide et l'indice d'ester.

V.1. Caractère physiques

V.1.1. Densité relative (AFNOR, 1994)

➤ Définition

La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à la masse d'un égal volume d'eau distillée.

➤ Principe

A l'aide d'un pycnomètre, peser successivement des volumes égaux d'huile essentielle et d'eau à la température de 20 °C.

La densité est donnée par la formule :

$$d_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1}$$

Où

♦**m₀** : masse en grammes du pycnomètre vide

♦**m₁** : masse en grammes du pycnomètre rempli d'eau

♦**m₂** : masse en grammes du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

V.1.2. L'indice de réfraction

➤ **Définition**

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

➤ **Principe**

Utiliser un réfractomètre permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.300 et 1.700 ; l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20 °C, une valeur de 1.333 pour l'eau distillée.

V.1.3. La miscibilité à l'éthanol

Une huile essentielle est dite miscible à V volumes et plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé à la température de 20 °C, lorsque le mélange de 1 volume de l'huile essentielle considérée avec V volumes de d'éthanol représente une phase homogène limpide et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre jusqu'à un total de 20 volumes.

V.1.4. Point de congélation

Le point de congélation d'une huile essentielle est la température constante ou maximale observée pendant la phase de la libération de la chaleur de solidification lorsque cette huile essentielle à l'état liquide est refroidie.

Les huiles essentielles sont placées dans des tubes à essais à l'intérieur d'un congélateur accompagnées d'un thermomètre.

V.2. Caractère chimique

V.2.1. L'indice d'acide

➤ **Définition**

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle.

➤ **Mode opératoire**

Dans un ballon ou une fiole, introduire la prise d'essai ($2 \text{ g} \pm 0.05$) et ajouter 5 millilitres d'éthanol (95%) et 5 gouttes de solution de phénolphaléine (0.2%) ;

Neutraliser le liquide avec la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0.1 mole/l) contenue dans une burette, jusqu'à obtention d'une couleur rose. On peut réserver éventuellement le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester.

L'indice est donc donné par la formule :

$$IA = 5.61 V / m$$

Où :

- ◆ 5,61 : correspond à 0,1mole/l de KOH ;
- ◆ V est le volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée ;
- ◆ m est la masse en grammes de la prise d'essai.

V. 2.2. L'indice d'ester

➤ Définition

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters dans 1g d'huile essentielle.

➤ Principe

Hydrolyser les esters par chauffage en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium et doser l'excès d'alcali par une solution titrée.

➤ Mode opératoire

Dans le ballon contenant la solution provenant de l'indice d'acide, on ajoute 25 millilitres d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0.5 mole/l, puis on adapte le réfrigérant, on place sur le chauffe ballon et on laisse chauffer pendant une heure.

On laisse refroidir, puis on démonte le réfrigérant et on ajoute 20 millilitres d'eau et 5 gouttes de la solution de phénolphtaléine à 0.2%.

On titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique (0.5 mole/l) ; parallèlement, on effectue un essai à blanc dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution provenant de l'indice d'acide par 5 millilitres d'éthanol.

➤ Expression des résultats

L'indice d'ester est calculé par la formule :

$$IE = 28,05/m (V_0 - V_1)$$

Où :

♦**28,05** : correspond à 0,5mol/l de KOH ;

♦**V_o** : volume en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc ;

♦**V₁** : volume en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination de l'indice ;

♦**m**: masse en grammes, de la prise d'essai.

VI. Dosage des composés phénoliques

VI.1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits des parties aériennes et des racines de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus* a été effectué spectrophotométriquement selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu (**Wong et al., 2006**).

➤ **Principe**

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le réactif de Folin-Ciocalteu consiste en une solution jaune acide contenant un complexe polymérique d'ions (hétéro-polyacides). En milieu alcalin, le réactif de Folin-Ciocalteu, oxyde les phénols en ions phénolates et réduit partiellement ses hétéro-polyacides, d'où la formation d'un complexe bleu (**Daels-rakotoarison, 1999**).

➤ **Mise en œuvre pratique**

La teneur totale en phénols totaux des extraits bruts de la plante étudiée est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Wong et al., 2006 ; Biglari et al., 2008 ; Wang et al., 2008**).

Une quantité de 100µl de l'extrait est mélangée avec 2,5 millilitres de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué) et laissée réagir pendant 5 minutes. 2,5mL d'une solution saturée de Na₂CO₃ sont ensuite ajoutés, après une heure à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 725nm (**Wong et al., 2006**).

Les résultats sont exprimés en milligrammes-équivalent d'acide gallique/gramme de matière végétale sèche. Une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de l'acide gallique à différentes concentrations est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons.

VI.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium et la soude. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune

avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm selon la méthode décrite par (Kim *et al.*, 2003).

➤ **Mise en œuvre pratique**

Une quantité de 100µl de l'extrait de chaque plante est mélangée avec 0,4 millilitre d'eau distillée et, par la suite avec 0,03 millilitre d'une solution de nitrite de sodium NaNO₂ à 5%. Après 5 minutes, 0,02 millilitres d'une solution d'AlCl₃ à 10% est additionnée. Après 5 minutes, on additionne au mélange 0,2 millilitre de solution de Na₂CO₃ (1M) et 0,25 millilitre d'eau distillée. L'ensemble est agité à l'aide d'un vortex et l'absorbance est mesurée à 510 nm.

La teneur en flavonoïdes est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée par la catéchine à différentes concentrations dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme-équivalent de catéchine par gramme de la plante.

VI.3. Dosage des tanins

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en utilisant la procédure rapportée par Sun *et al.*, 1998. Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré mesuré à 500nm.

➤ **Mise en œuvre pratique**

Un volume de 500 µl de l'extrait brut est ajouté à 3 ml de la solution vanilline/méthanol (4%) et un volume de 1,5 ml d'acide chlorhydrique. Le mélange a été laissé au repos pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à 500nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la catéchine comme contrôle positif. Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mgEC/g).

VII. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est un outil précieux pour l'analyse en phytochimie. Elle est assez peu onéreuse et son utilisation est très simple.

Une plaque de CCM se compose d'un support en aluminium, en verre ou en plastique, sur lequel est fixé une fine couche d'un milieu de sorption (silice, cellulose, alumine, polyamides...) comme phase stationnaire. On la place en position verticale ou légèrement

incliné dans une cuve en verre. Elle repose contre l'une des parois et est immergée d'environ 0,5 centimètre dans la phase mobile qui est constituée d'un ou de plusieurs solvants et dont les vapeurs auront préalablement saturé la cuve fermée. L'échantillon à étudier, déposé à l'état liquide par une micropipette et éventuellement séché, sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque. Le comportement de chaque molécule sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté, phase mobile et phase stationnaire (**Hennebelle, 2006**).

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes :

- directement si les substances sont colorées ;
- à l'aide d'un révélateur si elles sont incolores afin de les transformer en tâches colorées.

La plupart des substances ayant une absorption au dessus de 230nm sont étudiées par irradiation de lumière UV à ondes courtes ($\lambda_{\max} < 254\text{nm}$) ou à ondes longues ($\lambda_{\max} < 366\text{nm}$).

La révélation des polyphénols repose sur la coloration de leur spot à l'examen macroscopique, à leur comportement chromatographique (R_f) et à leur fluorescence en lumière UV.

Dans tous les cas il faut noter la position des tâches colorées juste à la fin de la chromatographie en les entourant avec un crayon (**Hamlat, 2006**).

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son R_f (*Rate factor* ou rapport frontal), qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile (front du solvant) $R_f = d/D$ et qui peut donc être compris entre 0 et 1 (**Hennebelle, 2006**).

VII.1. CCM des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes

Dans notre travail, nous avons réalisé la séparation des fractions acétate d'éthyle, n-butanol et les tanins sur différents supports et chacun avec un système de solvant approprié :

• 1^{er} système

Dans notre travail, nous avons utilisé des plaques de chromatographie sur couche mince de gel de silice prêtes à l'emploi à support en aluminium de taille 20 x 20 centimètres (Merck) pour la séparation des fractions acétate d'éthyle et n-butanol avec le système de solvant suivant :

Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/eau (100 :15 :0,3 :0,5) ; (v : v : v : v) (**Males et Médic- Saric, 2001**).

• 2^{ème} système

Nous avons utilisé aussi un autre système de migration qui consiste en l'utilisation d'une plaque de gel de silice à support en verre avec la phase mobile :

Toluène/ Acétone/ Acide formique (38:10 :5) ; (v : v : v) **Médic- Saric *et al.*, 2004**).

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques sont observées sous lampe UV à 365nm. Les Rf des spots sont enregistrés.

VII.2. CCM des extraits des tanins

L'analyse par chromatographie sur couche mince a été effectuée avec une plaque de gel de silice, sur support en verre, 20 cm × 20 cm. Nous avons utilisé comme éluant le système de solvant suivant : acétone/toluène/acide formique (30 :30 :10) (v/v/v).

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques sont observées sous lampe UV à 365nm. Les Rf des spots sont enregistrés.

VII.3. CCM des huiles essentielles

L'application de la CCM comme moyen d'analyse permet l'identification de certains constituants et surtout la mise en évidence des composés majoritaires des huiles essentielles.

Pour l'analyse de l'huile essentielle de nos échantillons, nous avons utilisé une plaque en verre de gel de silice de format 20 × 20 cm. Nous avons utilisé comme éluant le système de solvant suivant : toluène/ acétate d'éthyle (95 : 5) (v/v) (**Sticker, 1968**).

La détection de nos produits est réalisée en premier lieu avec la lampe U.V (366nm), mais parce que de nombreux composés n'absorbent pas la lumière U.V, on est contraint de rendre visible certaines taches en pulvérisant notre plaque avec une solution de vanilline sulfurique à 1%.

VIII. Méthode analyse de l'huile essentielle

A cause de l'importance des huiles essentielles dans le marché des cosmétiques et des parfums, les besoins de l'industrie de luxe ont conduit les chimistes à analyser les composants de diverses huiles essentielles qui sont des produits de base pour la fabrication de matières premières odorantes. Le développement de la technique dans notre monde industriel, ainsi que les exigences d'une législation de plus en plus complexe et sévère quant à la qualité et à la limitation des nuisances des produits industriels, confrontent le chimiste au double problème toujours croissant de la demande d'analyse et de leur complexité (**Laverdière *et al.*, 1999**).

VIII.1. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles ; elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être très

complexes, de nature et de volatilité très variées. La diversité des méthodes d'injection, de détection et le grand choix de colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces. Comme toutes les méthodes chromatographiques, la CPG repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire (**Fernandez et Cabrol-bass, 2007**).

Dans un CPG, la séparation des composés est réalisée de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne. La CPG permet l'individualisation et quantification des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcanes ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante (indice de Kováts) ou en programmation de température (indices de rétention) (**Barboni, 2006**).

➤ Conditions opératoires

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe de type HEWLE-PACKARD HP 6890 séries II.

- ◆ Une colonne capillaire apolaire standard (marque : J et W, modèle : DB-5), dimension : 30m×0,533mm.
- ◆ Le gaz vecteur est l'hélium.
- ◆ La température de l'injecteur est de 220°C et celle du détecteur de 220°C.
- ◆ La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 150°C, avec un accroissement de 2°C/mn.
- ◆ La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µl, 0,3 µl, 0,5 µl, 0,8 µl diluée dans l'acétone.
- ◆ Atténuation 10.
- ◆ Vitesse de déroulement de papier : 0,5cm/mn

IX. Étude de l'activité antioxydant

IX.1. Réduction du Fer : FRAP (*Ferric reducing antioxydant power*)

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Pan et al., 2008**, basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en Fe^{2+} . La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur

significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm.

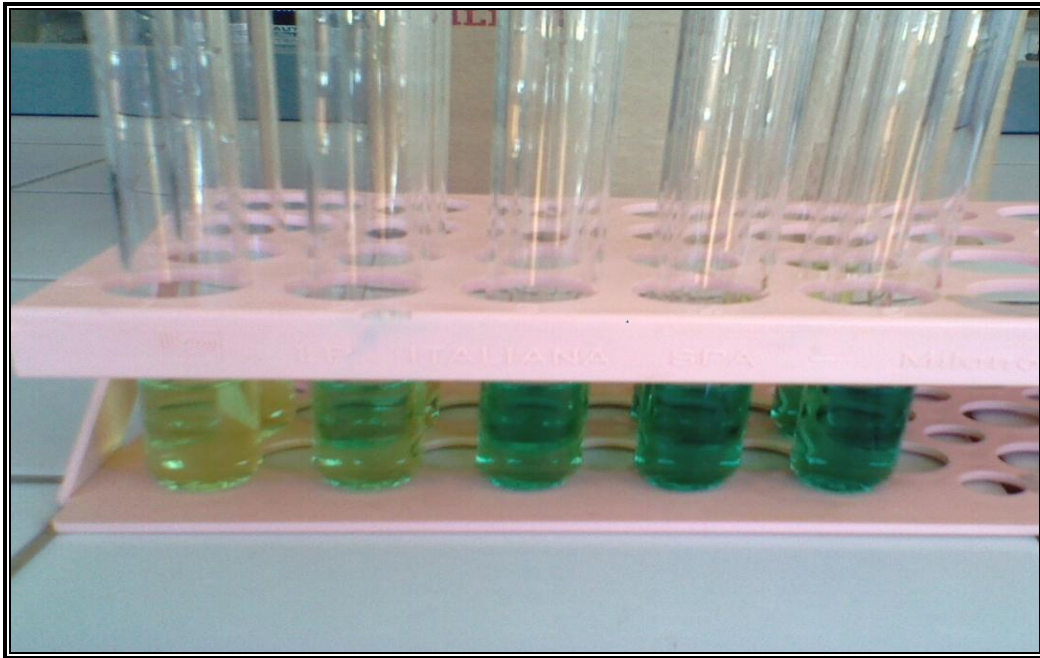


Photo 02: Réduction du fer ferrique en fer ferreux.

➤ **Mise en œuvre pratique**

Un volume égal à 1ml de l'échantillon à différentes concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1mg/mL) est mélangé avec 2,5 millilitres d'une solution tampon phosphate 0,2M (pH = 6.6) et 2,5 millilitres d'une solution de $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 minutes, puis refroidi à la température ambiante. Ensuite, 2,5 millilitres d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10minutes. 2,5 millilitres du surnageant sont ajoutés à 2,5 millilitres d'eau distillée et 500µl d'une solution de $(FeCl_3, 6H_2O)$ à 0.1% sont ajoutés également au mélange. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (PerkinElmer, Lambda 800).

L'acide ascorbique et le BHA sont utilisés comme contrôles positifs dans cette expérience aux mêmes concentrations choisies et dans les mêmes conditions expérimentales.

➤ **Expression des résultats**

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

IX.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)

Le DPPH (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radical libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Bozin *et al.*, 2008).

La méthode de DPPH présente plusieurs avantages du fait qu'elle est indépendante, simple et rapide. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.

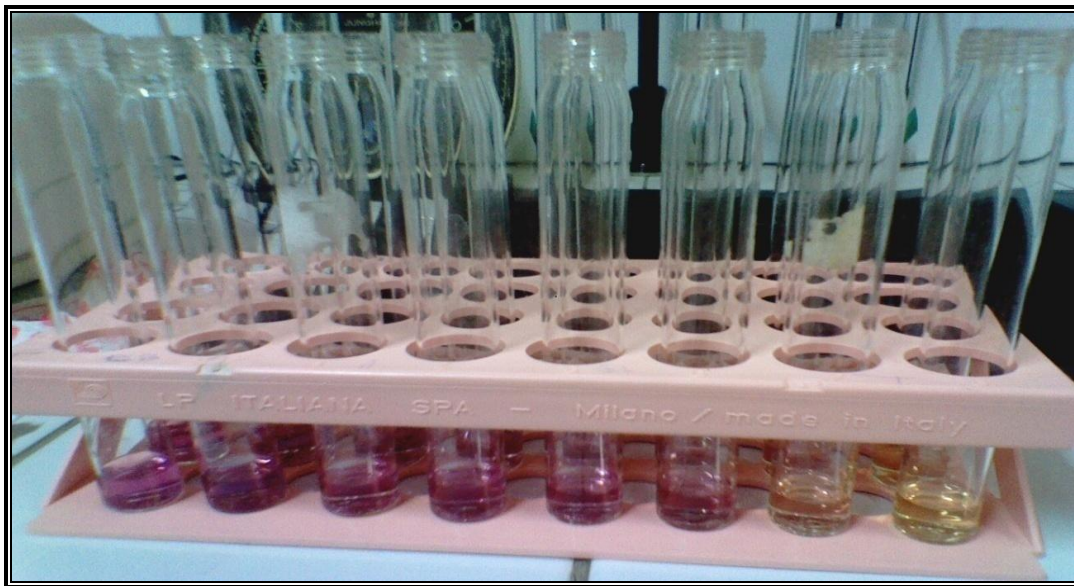


Photo 3 : Réduction de radical DPPH (de couleur violette au diphényl picryl-hydrazine (de couleur jaune).

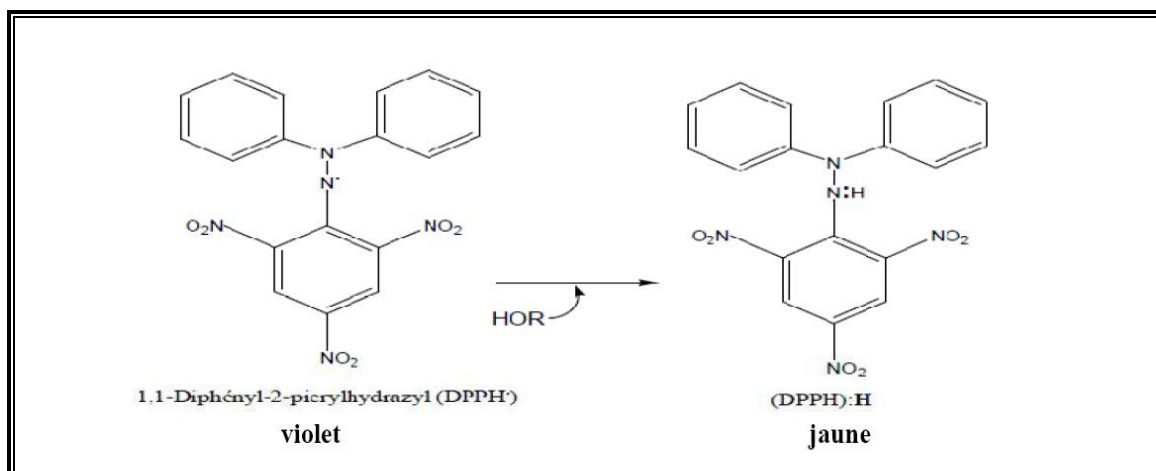


Figure 36 : Réaction d'un donneur d'hydrogène (antioxydant) avec le radical DPPH●

➤ **Mise en œuvre pratique**

Le protocole expérimental suivi pour étudier l'activité du piégeage du radical libre DPPH, est celui de **Benhammou *et al.*, 2007**.

A différentes concentrations, 50µl de chaque extrait méthanolique, sont ajoutés à 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à $6,34.10^{-5}$ M (0,0025g dans 100mL méthanol) ; pour chaque concentration un blanc est préparé. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé, en parallèle, en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30minutes et à la température ambiante, la réduction du DPPH s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune de la solution.

La lecture des absorbances est effectuée à 515nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

➤ **Expression des résultats**

❖ **Calcul des pourcentages d'inhibition**

Nous calculons ainsi les pourcentages d'inhibition par la formule suivante :

$$I\% = [(AC-AT)/AC]*100$$

♦**AC** : Absorbance du contrôle ;

♦**AT** : Absorbance du test effectué.

❖ **Calcul des IC₅₀**

IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour *Efficient concentration 50*), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH•. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées (**Bertoncelj *et al.*, 2007 ; Marxen *et al.*, 2007 ; Scherer *et al.*, 2009 ; Fabri *et al.*, 2009**).

❖ **Calcul de l'activité antiradicalaire (Scavenging activity)**

Nous pouvons déduire l'activité anti-radicalaire de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des IC₅₀ trouvées (**Maisuthisakul *et al.*, 2007**).

$$AAR = 1/IC_{50}$$

L'activité anti-radicalaire est comparée à celle de l'acide ascorbique et le BHA.

IX.3. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 scavenging activity)

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'U.V. Comme la concentration de H_2O_2 diminue par les composés piègeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également.

Néanmoins, il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, exigeant ainsi l'exécution d'une mesure blanche (**Malgalhaes et al., 2008**).

La réalisation d'une telle méthode nécessite beaucoup de rigueur au moment de la manipulation.

➤ **Mise en œuvre pratique**

Pour étudier l'activité du piégeage du H_2O_2 , nous avons utilisé la méthode décrite par **Ruch et al., 1989 in Shon et al., 2008** avec quelques modifications.

Un volume de 3,4 millilitres de l'extrait brut de chaque partie des plantes à étudier à la concentration de 0,1 μ g / millilitre, préparé dans une solution tampon phosphate à 0,1M (pH = 7,4) sont mélangés avec 600 μ l d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 43mM (préparée dans le même tampon phosphate).

La réaction des échantillons avec le peroxyde d'hydrogène est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkin Elmer, Lambda 800 spectrophotometer) à 230 nm pendant 40 minutes à 10 minutes d'intervalle.

Dans les mêmes conditions opératoires, le BHA (butylhydroxyanisole), à la même concentration choisie, est utilisé comme contrôle positif.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ du piégeage du } H_2O_2 = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

◆**AC** : Absorbance du contrôle ;

◆**AT** : Absorbance du test.

IX.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta carotène (*β-carotene bleaching method*)

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet consiste à mesurer, à 470 nm, la décoloration du β -carotène résultant de son oxydation par les produits de décomposition de l'acide linoléique.

La dispersion de l'acide linoléique et du β -carotène dans la phase aqueuse est assurée par du Tween. L'oxydation de l'acide linoléique est catalysée par la chaleur (50 °C) de manière non spécifique. L'addition d'antioxydants purs ou sous forme d'extraits végétaux induit un retard de la cinétique de décoloration du β -carotène. Cette méthode est sensible, rapide et simple s'agissant d'une mesure spectrophotométrique dans le visible. Elle présente également l'avantage de pouvoir être couplée à la chromatographie sur couche mince.

Cependant, l'oxydation induite par voie thermique est non contrôlée et donc non spécifique, ce qui conduit bien souvent à une variabilité des résultats (**Laguerre *et al.*, 2007**).

➤ Mise en œuvre pratique

Pour étudier l'activité antioxydante par la méthode de décoloration du β -carotène, nous avons choisi de travailler avec le protocole expérimental décrit par **Sun *et al* (2005) in Ozsoy *et al.*, 2008**, avec quelques modifications apportées à la méthode.

Pour préparer l'émulsion du β -carotène, 2 milligrammes de ce dernier sont dissous dans 10 millilitres de chloroforme, puis 1 millilitre de cette solution est mélangé avec 20 milligrammes d'acide linoléique purifié et 200 milligrammes du Tween 40 (tous ces produits sont fournis par Fluka). Le chloroforme est évaporé par un rotavapor (BUCHI Rotavapor R-200) et le résidu obtenu est repris par 50 millilitres de peroxyde d'hydrogène à 30%.

Ensuite, 5 millilitres de cette émulsion sont préparés, auxquels 200 μ l d'extraits bruts méthanoliques de nos plantes étudiées ou d'antioxydant de référence (BHA) à la concentration 2,5 mg/mL sont ajoutés. Le mélange est bien agité et la lecture de l'absorbance à 470 nm se fait immédiatement à t_0 contre un blanc qui contient l'émulsion sans le β -carotène.

Les tubes couverts sont placés dans un bain marie réglé à 50 °C et la lecture de l'absorbance est faite toute les 10 minutes durant 60 minutes.

Un contrôle négatif est réalisé en parallèle, comprenant 5 millilitres de l'émulsion du β -carotène et 200 μ l de méthanol.

➤ **Expression des résultats**

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [1 - (A_o - A_t / A_o^* - A_t^*)] \times 100 \text{ (Ozsoy et al., 2008).}$$

♦AA : Activité antioxydante ;

♦A[•] : Absorbance de l'échantillon à t_o ;

♦At : Absorbance de l'échantillon après incubation de 60 minutes ;

♦A_o^{*} : Absorbance du contrôle négatif à t_o ;

♦A_t^{*} : Absorbance du contrôle négatif après incubation de 60 minutes.

Chapitre 3 : Résultats

I - Screening phytochimiques

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur différents extraits préparés à partir des parties aériennes et des racines de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus* en utilisant des solvants de polarités différentes et des réactifs spécifiques de révélation.

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de nos plantes. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé de la partie aérienne et des racines de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus* mentionnés dans le **tableau n° 07**, montrent la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols dans la partie aérienne et dans les racines avec des intensités variables.

La mise en évidence des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique des deux parties pour les deux plantes est confirmée par l'apparition d'une couleur rose ou rouge intense en contact avec la tournure de magnésium. Les tanins sont présents avec une intensité importante dans la partie aérienne. Sa présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleue verdâtre dans la partie aérienne et dans les racines ; il s'agit donc des tanins catéchiques.

Le test positif des stérols et stéroïdes nous a montré leurs présences dans les deux parties des deux plantes avec une apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert et, pour les hétérosides stéroïdiques un test positif confirmé par l'apparition des colorations verte-bleue.

Tableau 07 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques appartenant aux différentes parties de deux plantes étudiées.

Espèce étudiée	ssp coloratus		ssp euciliatus	
Partie étudiée				
Familles chimiques recherchées	Partie aérienne	Racine	Partie aérienne	Racine
Amidon	-	-	-	-
Saponosides	- IM=50	- IM= 30	- IM= 40	- IM= 30
Tanins cathéchiques	+++	+	+++	++
Tanins galliques	-	-	-	-
Flavonoïdes	+++	+	+++	++
Composé réducteurs	+	-	+	-
Alcaloïdes	-	-	-	-
Coumarine	-	-	-	-
Anthocyane	-	-	-	-
Stérols et stéroïdes	++	+	+++	++
Hétérosides stéroïdique	++	+	+++	++
Hétérosides triterpéniques	-	-	-	-

(+) : Présence faible

(+++): Présence forte

(++) : Présence moyenne ;

(-) : Absence.

II. Les rendements en extraits secs

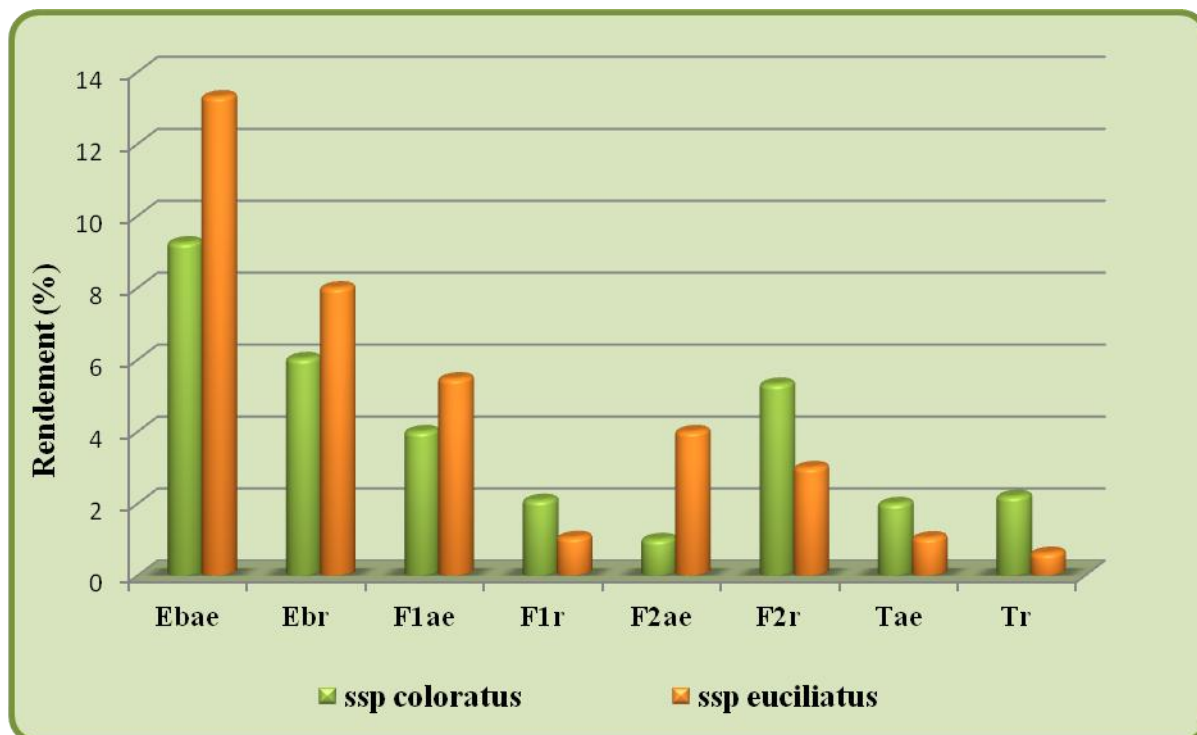
Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondants dans nos plantes nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts méthanoliques, les flavonoïdes (fraction acétate d'éthyle et n-butanol), les tanins. Le rendement déterminé par rapport à 100 grammes de matériel végétal sec et broyé est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau n° 08**:

Tableau 08 : Les rendements en extraits obtenus à partir de deux parties de la ssp coloratus et la ssp euciliatus.

Les extraits	Les solvants utilisés	Rendements %			
		ssp coloratus		ssp euciliatus	
		Partie aérienne	Racine	Partie aérienne	Racine
Extrait brut	Méthanol	9,25	6,03	13,31	8
Flavonoïdes : fraction acétate d'éthyle	Acétate d'éthyle	4	2,09	5,47	1,06
Flavonoïdes : fraction Butanolique	n-butanol	1	5,32	4	3
Tanins	Acétone/Eau	2	2,20	1,05	0,62

Les résultats obtenus montrent que les rendements en extraits des deux parties de la ssp coloratus et la ssp euciliatus sont plus ou moins variables et sont plus importants dans la partie aérienne par rapport aux racines. Cependant, le rendement trouvé dans l'extraction des fractions butanolique et les tanins des parties racines de ssp coloratus est plus importante.

Pour les deux plantes et leurs deux parties considérées, le plus grand rendement déterminé est raisonnablement celui de l'extrait brut. Ces rendements viennent confirmer les intensités des résultats des tests phytochimiques.



Ebae : extrait brut partie aérienne ;

F1ae : fraction acétate d'éthyle partie aérienne ;

Ebr : extrait brut racine ;

F1r : fraction acétate d'éthyle racine ;

F2ae : fraction butanolique partie aérienne ;

Tae : Tanin partie aérienne ;

F2r : fraction butanolique racine ;

Tr : Tanin racine.

Figure 37: Rendements en extraits obtenus à partir des deux parties de la ssp coloratus et de la ssp euciliatus

III. Extraction des huiles essentielles

III.1. Résultats d'extraction par hydro-distillation

Les huiles essentielles sont extraites des matériaux végétaux secs, avant, pendant et après la floraison. Le rendement en huiles essentielles varie avec la plante utilisée, le matériel employé pour l'extraction et la méthode d'extraction. Le **tableau n° 09** représente les rendements en huiles essentielles obtenus pour les deux plantes étudiées.

Tableau 09: Teneur en huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *eucliatus* au cours des différents stades de développement.

	Rendement en H.E de la ssp <i>coloratus</i> (%)	Rendement en H.E de la ssp <i>eucliatus</i> (%)	Différents stades de développement
Mars	0,15	-	Avant floraison
Avril	0,24	-	
Mai	0,45	-	Pleine floraison
Juin	0,20	-	Après floraison
	-	2	Avant floraison
Juillet	-	3,40	Pleine floraison
Aout	-	1,50	Après floraison
Septembre	-	1,72	

La **figure 38** montre la variation de la teneur relative de l'huile essentielle en fonction de la date de cueillette de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *eucliatus*.

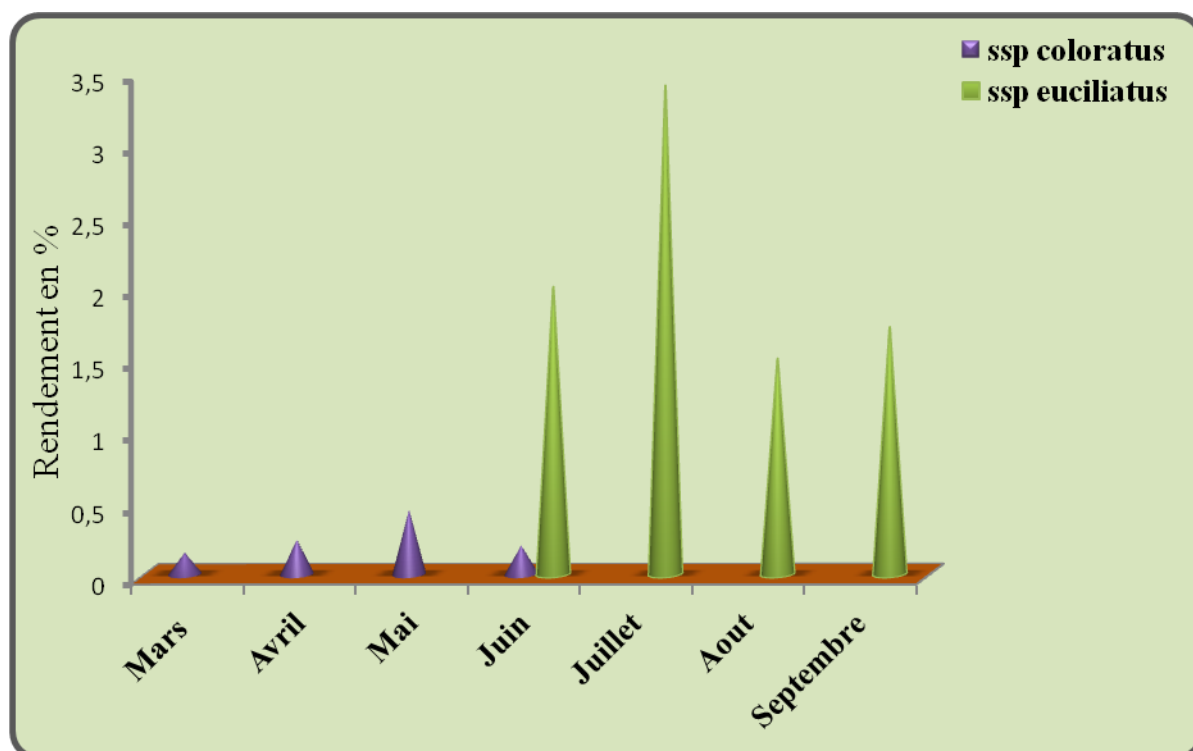


Figure 38 : Rendement en huile essentielle obtenue par hydro-distillation.

❖ Teneur en huiles essentielles de la ssp coloratus

L'huile essentielle obtenue par hydro-distillation est un liquide visqueux de couleur jaune verdâtre et claire avec une odeur forte et une saveur piquante et amère.

Les résultats des teneurs en huiles essentielles au cours des différents stades de développement de la plante révèlent une variation de rendement très importante (**0,15% à 0,24%**) avant floraison. Cette teneur augmente progressivement pour atteindre son maximum (**0,45%**) durant la floraison puis, elle diminue après la floraison (**0,2%**). Le rendement maximum est donc obtenu au mois de mai (période de pleine floraison).

❖ Teneur en huiles essentielle de la ssp euciliatus

Elle donne une solution huileuse, de couleur jaune foncée, d'odeur très forte et d'une saveur piquante et amère.

Les rendements en huiles essentielles de la plante varient comme suit : (**2%**) avant floraison, (**3,40%**) en pleine floraison et de (**1,50%**) à (**1,72%**) après la floraison. La pleine floraison correspond au mois de juillet.

III.2. Caractères physicochimiques de l'huile essentielle

Les résultats des caractères physicochimiques des huiles essentielles des deux sous espèces, consignés dans le **tableau n°10** sont calculés à partir des échantillons obtenus pendant la phase de pleine floraison.

III.2.1. Caractères physiques

➤ Densité relative

Les valeurs des densités relatives se limitent entre **0,8291** et **0,8810** pour la ssp coloratus et **0,9521** à **0,9602** pour la ssp euciliatus. D'après ces résultats on peut dire que l'huile essentielle de la ssp euciliatus est plus dense que celle de la ssp coloratus.

➤ Indice de réfraction

L'indice de réfraction de l'huile essentielle de la ssp coloratus est de **1,4609** ; pour la ssp euciliatus il est de **1,4872**. On constate que la ssp euciliatus présente un indice de réfraction légèrement supérieur à celui de la ssp coloratus.

➤ Miscibilité à l'éthanol

La miscibilité à l'éthanol de l'huile essentielle de la ssp coloratus est d'un volume d'huile essentielle pour deux volumes d'éthanol (**1V/2V**) et que pour la ssp euciliatus, elle est d'un volume d'huile essentielle pour trois volumes d'éthanol (**1V/3V**).

Donc l'huile essentielle de la ssp coloratus est plus miscible que la ssp euciliatus. Ces variations sont dues probablement à la densité (la ssp euciliatus étant dense que la coloratus).

➤ **Point de congélation**

Le point de congélation des deux sous espèces est inférieur à **-18°C (<-18°C)**.

III.2.2. Caractères chimiques

➤ **Indice d'acide**

L'indice d'acide de la sous espèce *coloratus* varie de **2,580 à 3,415**.

➤ **Indice d'ester**

La valeur d'indice d'ester de cette sous espèce varie de **98,49 à 99,12**.

Remarque

En ce qui concerne la sous espèce *euciliatus*, les indices chimiques n'ont pas pu être déterminés car après l'addition des premières gouttes de KOH éthylique, une couleur « verte noirâtre » apparaît, et non pas la couleur « rose » attendue.

Ces résultats négatifs sont dus probablement à sa composition chimique.

Tableau 10 : Caractéristiques physiques et chimiques des deux ssp de *Thymus ciliatus*.

Caractères physico-chimiques	ssp <i>coloratus</i>	ssp <i>euciliatus</i>
Densité relative	0,8291-0,8810	0,9521-0,9602
Indice de réfraction	1,4609	1,4872
Miscibilité à l'éthanol	2 volumes d'éthanol pour 1 volume d'H.E (2V/1V)	3 volumes d'éthanol pour 1 volume d'H.E (3V/1V)
Point de congélation	<-18	<-18
Indice d'acide	2,580 à 3,415	–
Indice d'ester	98,49 à 99,12	–

IV. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées parce qu'elles sont réputées pour leurs excellentes propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Pour ces raisons, un dosage de ces composés a été effectué pour les deux parties de la ssp *coloratus* et la ssp *euciliatus* et ce, par la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-Ciocalteu. Les teneurs obtenues sont exprimées en mg, équivalent acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (**figure n° 39**).

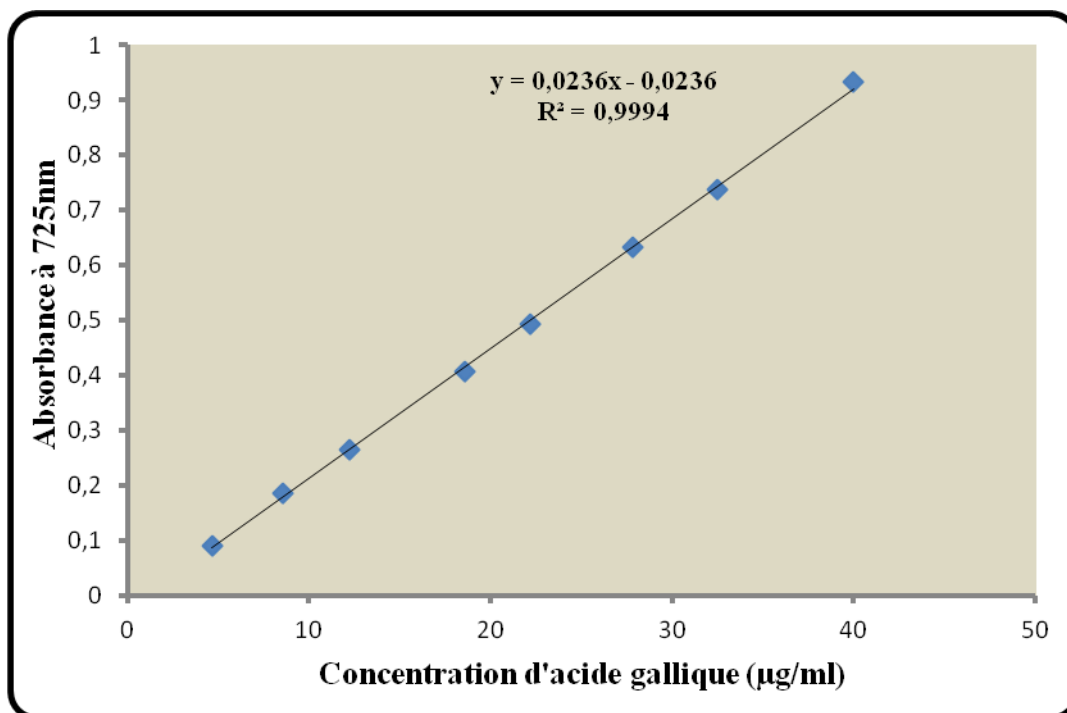


Figure 39 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

Pour les deux parties de la plante étudié *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et la ssp *euciliatus* nous avons remarqué une variabilité des teneurs en phénols totaux (**figure n° 40**). La teneur la plus élevée est constatée dans la partie aérienne de la ssp *euciliatus*, elle est de l'ordre de **636,30mg GAE/g**, et pour la ssp *coloratus*, elle est de l'ordre de **606,9mgGAE/g**. suivi par les racines qu' ils possèdent une teneur en polyphénols totaux élevée avec une concentration de **314,70 mg GAE/g** pour la ssp *euciliatus*, et par une concentration de **177,07 mg GAE/g** pour la ssp *coloratus*.

En définitif, on peut dire que la ssp *euciliatus* possède une teneur en polyphénols totaux élevée par rapport à la ssp *coloratus*. Ces résultats importants reflètent les données trouvées dans la **figure n° 37** où nous avons enregistré des rendements élevés des extraits bruts ce qui prouve la richesse de chaque partie de la plante en polyphénols à savoir les flavonoïdes et les tanins.

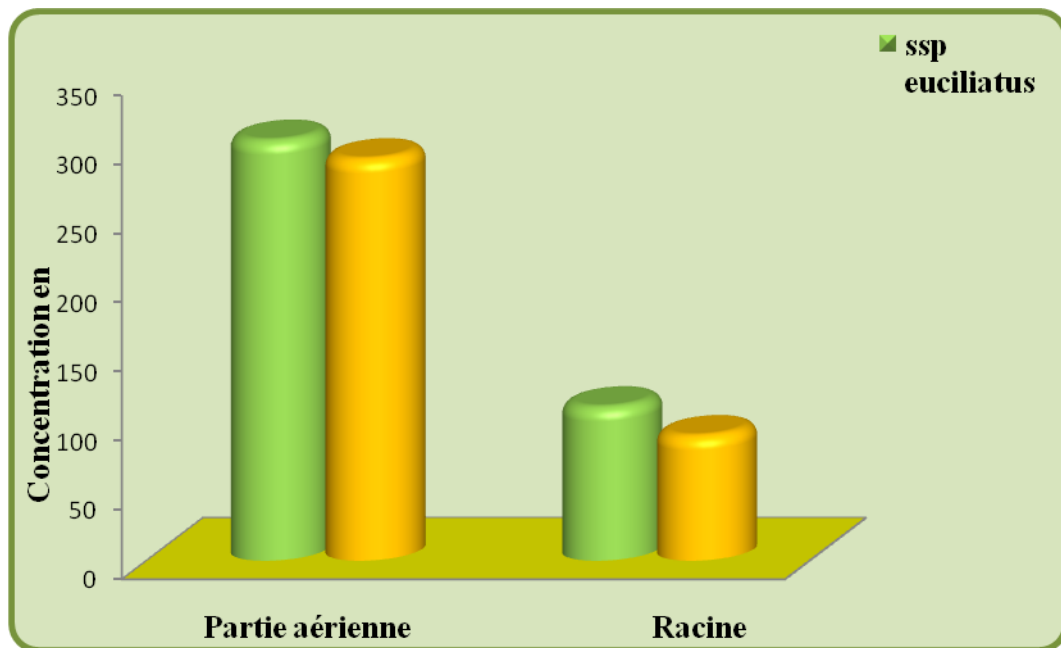


Figure 40 : Teneurs en phénols totaux pour les deux parties des deux plantes étudiées.

V. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est réalisé par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium (AlCl₃) décrite par (Kim *et al.*, 2003). La catéchine prise comme contrôle positif, nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage avec R² égal à 0,999 ; résultat qui a permis de calculer la teneur en flavonoïdes pour les différents extraits qui est exprimée en mg équivalent de catéchine (EQC) par gramme de matière végétale sèche.

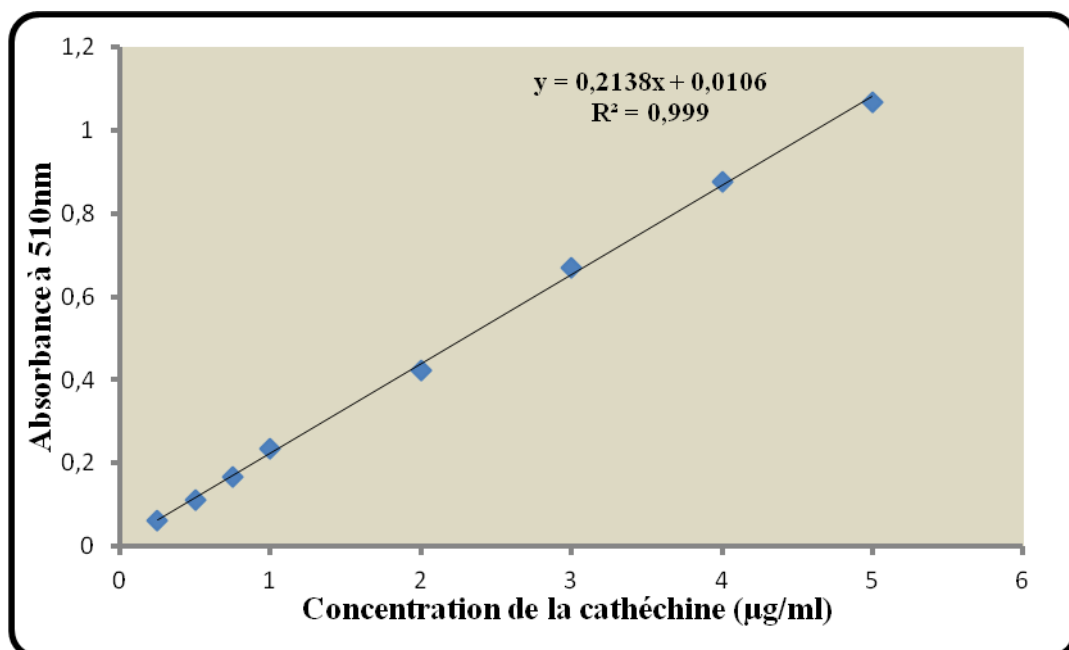


Figure 41 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

Comme le montre l'histogramme illustré dans la **figure n° 42**, la teneur en flavonoïdes varie entre la partie aérienne et les racines pour les deux ssp étudiées, la teneur la plus élevée est constatée dans la partie aérienne de la ssp *eucliatius* et est de l'ordre **65,4 mg EQC /g**, suivie par la ssp *coloratus* **62,4mg EQC /g**. Concernant les racines, elles possèdent une teneur de **31,05 mg EQC /g** pour la ssp *eucliatius* et **17,1 mg EQC /g** pour la ssp *coloratus*.

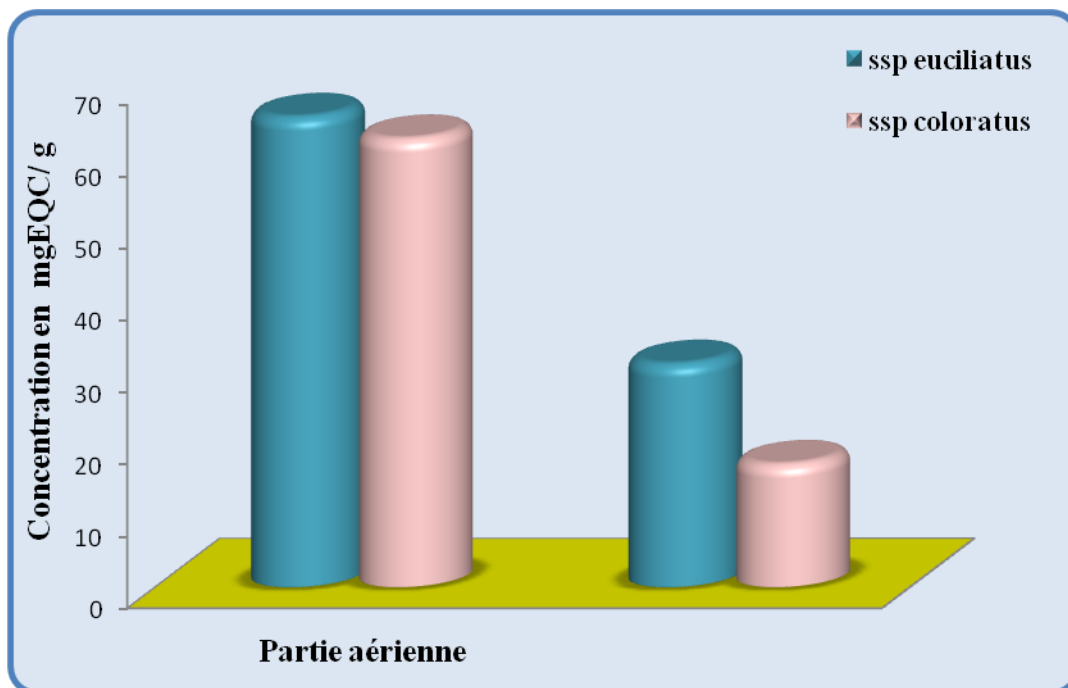


Figure 42 : Teneurs en flavonoïdes pour les deux parties de deux plantes étudiée.

VI. Dosages des Tanins

La quantification des tanins a été effectuée par une méthode adaptée par **Sun et al 1998**. Une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant la catéchine comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EQC/g) (**Figure n° 43**).

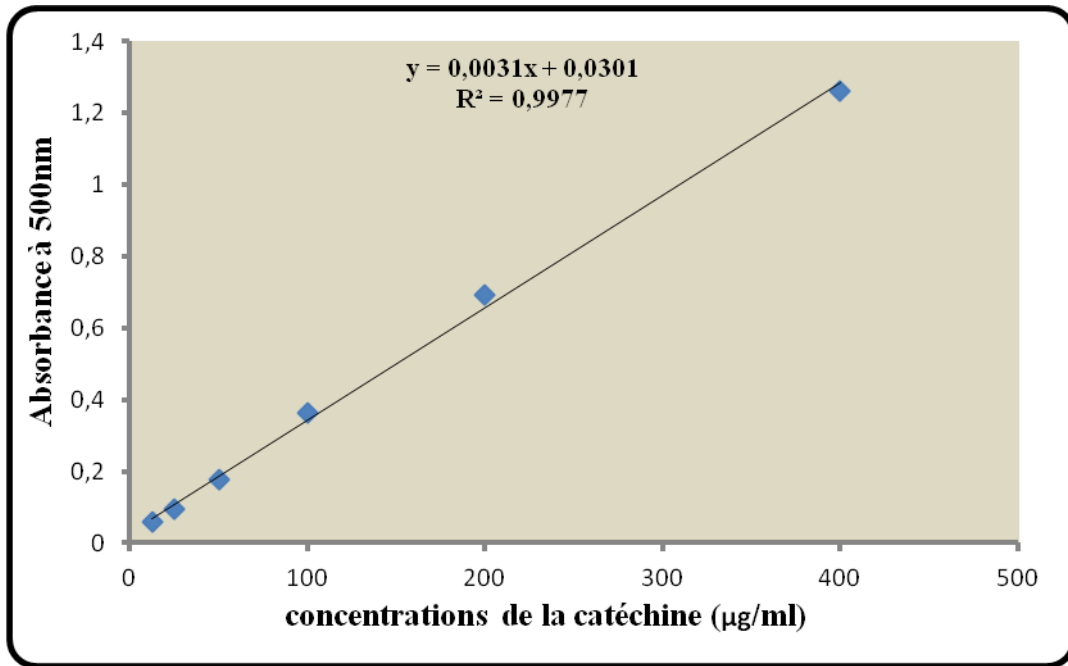


Figure 43 : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins.

Les teneurs en tanins des deux plantes étudiées varient entre **67,58** et **200,93 mg EQC /g**, comme le rapporte l'histogramme illustré dans la **figure n°44**, la teneur la plus élevée est celle de la partie aérienne de la ssp *eucliatatus* avec une concentration de **200,93 mg EQC /g**, suivi par la partie aérienne de la ssp *coloratus* avec une concentration de **132 mg EQC /g**. Concernant les racines, elles possèdent une teneur de **108,03 mg EQC /g** pour la ssp *eucliatatus* et de **67,58 mg EQC /g** pour la ssp *coloratus*.

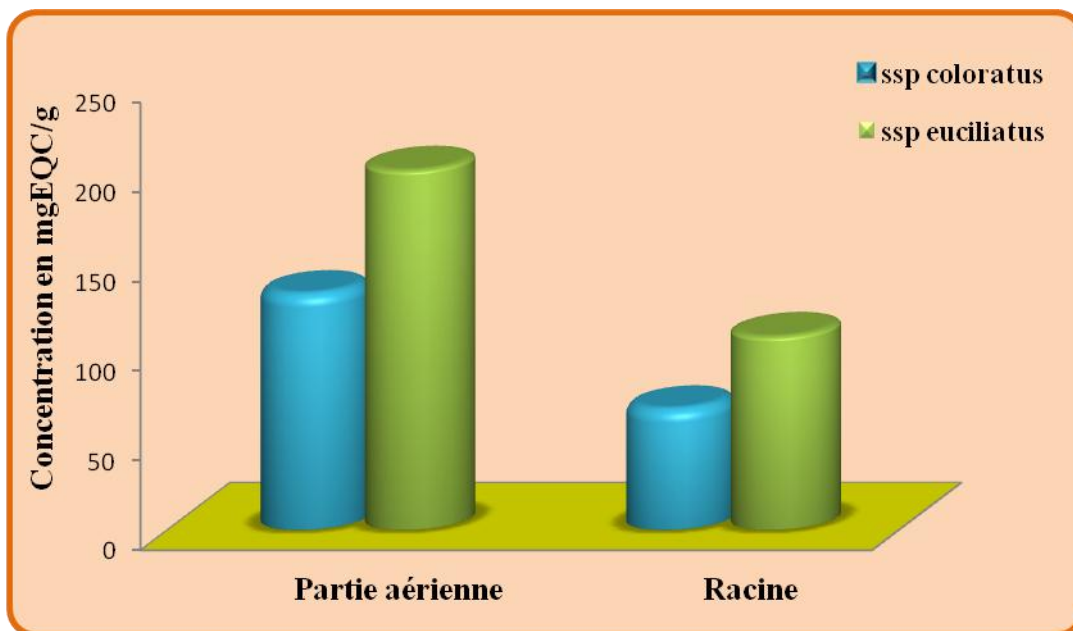


Figure 44: Teneurs en tanins pour les deux parties de deux plantes étudiée.

VII. Analyse chromatographique sur couche mince

Pour un essai d'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différents extraits, nous avons eu recours à l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM) puisqu'elle est l'une des méthodes habituelles pour la séparation et la purification des différents constituants d'un extrait végétal et qui est simple à mettre en œuvre.

VII.1. CCM des fractions acétate d'éthyle et n-butanol des flavonoïdes

Dans notre étude, nous avons réalisé une chromatographie sur couche mince pour les fractions d'acétate d'éthyle et la fraction butanoliques pour les deux parties des deux plantes étudiées sur deux différents supports et chacun avec un système de solvant approprié :

- **Premier système** : il consiste en une plaque de gel de silice à support d'aluminium avec le système de solvants suivant : Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/eau (100 :15 :0,3 :0,5) ; (v : v : v : v) (**Males et Médic- Saric, 2001**).

- **Deuxième système** : il consiste en une plaque de gel de silice à support de verre avec le système de solvants suivant : Toluène/ Acétone/ Acide formique (38:10 :5) ; (v : v : v) (**Médic-Saric et al., 2004**).

Après le développement du chromatogramme et après que le front du solvant d'élution ait atteint la ligne supérieure, la plaque a été retirée, séchée et examinée sous une lampe UV à 365nm afin d'avoir une identification des constituants présents.

Les systèmes de solvants utilisés nous ont permis de séparer plusieurs composés dans les fractions d'acétate d'éthyle et n-butanol de nos échantillons (**tableau 11, 12**).

Après la révélation sous lampe UV à 365nm, les Rf des différents extraits flavonoïdiques ont été comparés avec ceux de témoins utilisés ainsi que ceux établis par **Benhammou, (2006)** ; **Males et Médic- Saric, 2004** (**tableaux 13, 14**).

En effet, un Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé sur un support donné.

Tableau 11: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits Flavonoïdiques de la partie aérienne et des racines de la ssp coloratus et de la ssp euciliatus.

Système de solvants 1 : Chloroforme/ Méthanol/ Acide acétique/eau : (100 :15 :0,3 :0,5).

Adsorbant : gel de silice.

Sous espèces étudiées	Flavonoïdes	Rf de la partie aérienne	Couleur des spots	Rf des racines	Couleur des spots
coloratus	Acétate d'éthyle	0,04	Violet	0,05	Blanc fluorescente
	n-butanol	0,09 0,70	Violet Jaune	0,10 0,80	Bleu Blanc
euciliatus	Acétate d'éthyle	0,07	Orange	0,09	Violet
	n-butanol	0,10 0,13	Blanc Bleu violet	0,09 0,13	Violet Bleu violet

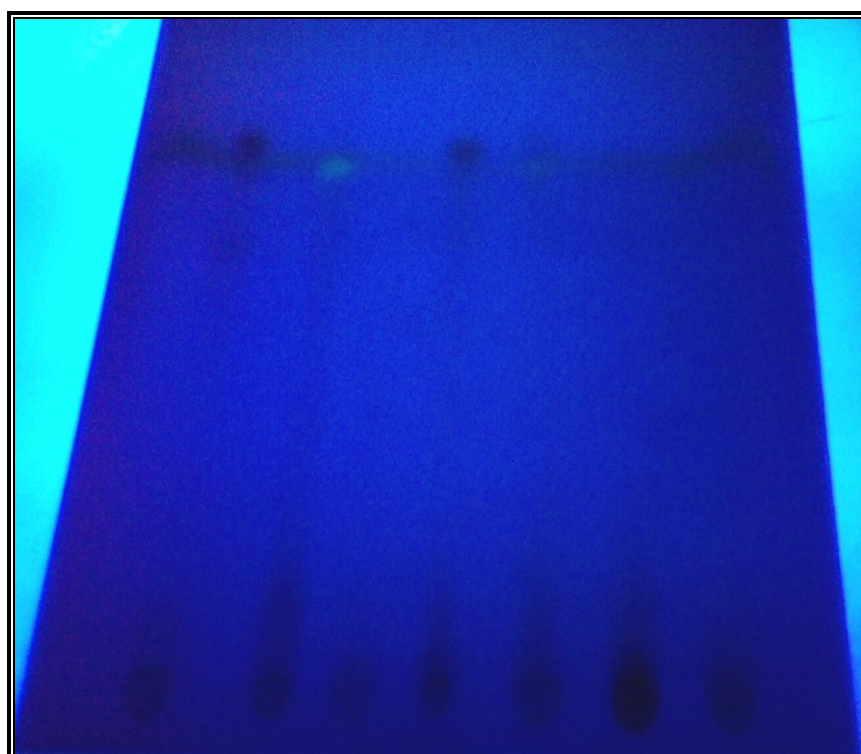


Figure 45 : Chromatogramme résultant de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoides (système de solvants1).

Par le biais de ce système de solvants, nous avons pu mettre en évidence pour la ssp coloratus la présence d'un seul composé dans la fraction acétate d'éthyle et de deux composés dans la fraction butanolique pour la partie aérienne et pour les racines.

Dans la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne et des racines de la ssp euciliatus un seul composé est mis en évidence tandis que pour la fraction butanolique deux composés ont été séparés.

Tableau 12: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits Flavonoïdiques de la partie aérienne et des racines de la ssp coloratus et la ssp euciliatus.

Système de solvants 2 : Toluène/ Acétone/ Acide formique (38:10 :5) ; (v : v : v).

Adsorbant : gel de silice.

Sous espèces étudiées	Flavonoïdes	Spots (n°)	Rf de la partie aérienne	Spots (n°)	Rf des racines
coloratus	Acétate d'éthyle	1	0,05	1	0,05
		2	0,10	2	0,18
		3	0,18	3	0,28
		4	0,30	4	0,35
		5	0,35	5	0,46
		6	0,40	6	0,66
		7	0,60	7	0,70
		8	0,66		
		9	0,70		
	n-butanol	1	0,09	1	0,05
		2	0,17	2	0,18
		3	0,30	3	0,60
4		0,47			
5		0,60			
6		0,7			
euciliatus	Acétate d'éthyle	1	0,18	1	0,05
		2	0,28	2	0,18
		3	0,35	3	0,28
		4	0,37	4	0,33
		5	0,60	5	0,35
		6	0,66	6	0,62
		7	0,70	7	0,66
		8	0,74	8	0,70
		9		9	0,74
	n-butanol	1	0,09	1	0,05
		2	0,18	2	0,17
		3	0,30	3	0,35
4		0,60			

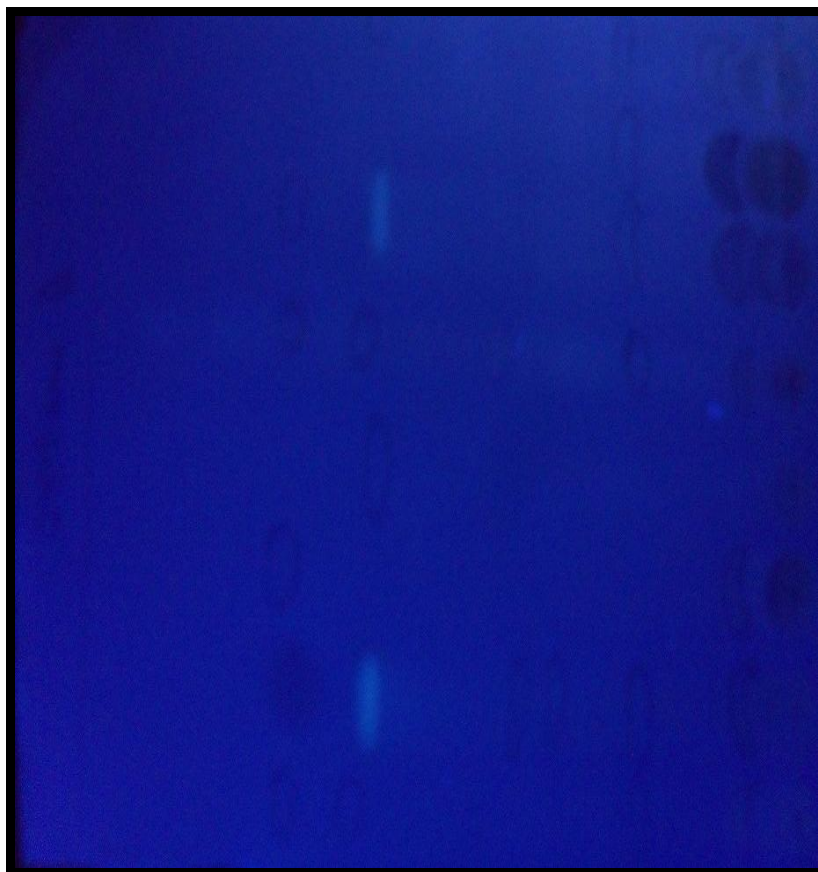


Figure 46 :Chromatogramme résultant de la CCM des fractions AcOEt et n-buOH des flavonoïdes (système de solvants 2).

Dans ce système de solvants, nous constatons que dans la partie aérienne de la ssp coloratus le nombre de taches dans la fraction acétate d'éthyle atteint neuf spots et sept pour les racines alors que dans la fraction butanolique, six spots sont présents dans la partie aérienne et trois dans les racines.

Concernant la ssp euciliatus le nombre de taches dans la fraction acétate d'éthyle est de huit spots pour la partie aérienne et neuf pour les racines alors que dans la fraction butanolique il y a présence de quatre spots pour la partie aérienne et trois spots pour les racines.

Les valeurs des Rf des différents extraits flavonoïdiques ont été comparés avec ceux des témoins utilisés et ceux établis par **Benhammou, 2006 (tableaux 13)** pour le système de solvants 1, et avec les témoins utilisés et ceux établis par **Males et Médic- Saric, 2004 (Tableau 14)** pour le système 2.

Tableau 13 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des témoins des composés phénoliques (Benhammou, 2006).

Système solvants 1 : Chloroforme/méthanol/acide acétique/ eau ; (100:15:0,3: 0,5) ;(v/v/v/v).

Témoins	Rf	Couleur des spots	Classes Phénoliques
Rutine	0,04	Violet	Flavonol
Catéchine	0,09	Violet	Flavanol
Acide gallique	0,13	Bleu violet	Acide phénol
Quercétine	0,41	Jaune	Flavonol
Ac.paracoumarique	0,64	Violet	Acide phénol
Pyrocatechol	0,71	Violet	Phénol simple

Tableau 14: Valeurs des Rf des étalons (Males et Médic- Saric, 2004).

Système de solvant 2 : Toluène/ acétone/ acide formique (38 :10 :5) (v/v/v).

Etalons		Rf
Flavanones	Flavanone	0,62
	Naringénine	0,44
Flavones	Flavone	0,85
	3-Hydroxyflavone	0,66
	6- Hydroxyflavone	0,56
	6'-Hydroxyflavone	0,48
	7-Hydroxyflavone	0,46
	3,6-Dihydroxyflavone	0,46
	3,7- Dihydroxyflavone	0,47
	Morine	0,23
	Chrysine	0,56
	Galangine	0,60
Apigénine	0,37	
Flavonols	Quercétine	0,35
	Kaempférol	0,40
Acides phénoliques	Acide <i>o</i> -coumarique	0,48
	Acide <i>p</i> -coumarique	0,47
	Acide férulique	0,45

L'identification des composés séparés dans les deux systèmes a donné les résultats consignés dans le **tableau n°15** et **16**.

Tableau 15: Composés identifiés dans le système 1 pour les deux espèces étudiées.

Sous espèce étudiée	Fraction AcOEt Partie aérienne		Fraction AcOEt Partie racine		Fraction n-buOH Partie aérienne		Fraction n-buOH Partie racine	
	Composé	Rf	Composé	Rf	Composé	Rf	Composé	Rf
coloratus	Rutine	0,04	/	/	Catéchine	0,09	/	/
euciliatus	/	/	Catéchine	0,09	Acide gallique	0,13	Catéchine	0,09
							Acide gallique	0,13

Tableau 16 : Composés identifiés dans le système 2 pour les deux espèces étudiées.

Sous espèce étudié	Fraction AcOEt (partie aérienne)		Fraction AcOEt (Racine)		Fraction n-butOH (partie aérienne)		Fraction n-butOH (Racine)	
	Composé	Rf	Composé	Rf	Composé	Rf	Composé	Rf
coloratus	quercétine	0,35	quercétine	0,35	3,7-Dihydroxyflavone	0,47	Galangine	0,60
	Kaempférol	0,40	7-Hydroxyflavone	0,46				
	Galangine	0,60	3-Hydroxyflavone	0,66	Galangine	0,60		
	3-Hydroxyflavone	0,66						
euciliatus	Quercétine	0,35	Quercétine	0,35	Galangine	0,60	Quercétine	0,35
	Apigénine	0,37	Flavanone	0,62				
	Galangine	0,60	3-Hydroxyflavone	0,66				
	3-Hydroxyflavone	0,66						

En comparant les Rf des spots avec ceux des étalons pour les deux systèmes de solvant choisi, on a pu mettre en évidence un certain nombre de composés dans la partie aérienne et dans les racines des espèces étudiées.

❖ Dans la fraction AcOEt des parties aériennes de la ssp *coloratus*, nous avons mis en évidence un composé phénolique qui est la rutine, deux flavonols qui sont la quercétine et le kaempférol et deux flavones qui sont la galangine et le 3-Hydroxyflavone, et pour les racines un seul flavonol qui est la quercétine et deux flavones qui sont le 7-hydroxyflavone et le 3-hydroxyflavone.

Tandis que dans la fraction n-buOH des parties aériennes, nous avons mis en évidence la présence de la catéchine, deux flavones à savoir le 3,7-dihydroxyflavone et la galangine. Dans les racines, un seul flavone est présent, la galangine.

❖ Dans la fraction AcOEt des parties aériennes de la ssp *eucliatius*, un seul flavonol la quercétine et trois flavones l'apigénine, la galangine et le 3-hydroxyflavone sont mis en évidence. Pour les racines nous avons pu identifier un composé phénolique qui est la catéchine, un flavonol qui est la quercétine, une flavone le 3-hydroxyflavone et un flavanone. Concernant la fraction n-buOH des parties aériennes un flavone est mis en évidence la galangine et un composé phénolique qui est l'acide gallique ; une flavonol qui est la quercétine et deux composés phénoliques qui sont la catéchine et l'acide gallique pour les racines.

VII.2. CCM des extraits des tanins

Pour cette séparation l'éluant sélectionné est le système : acétone/toluène/acide formique (30 :30 :10) (v/v/v) (Lea, 1978). Ce dernier a révélé neuf taches dans l'extrait de la ssp *coloratus* et 15 taches dans celui de la ssp *eucliatius*. Les Rf de ces composés sont donnés dans le **tableau n°17**.

Tableau 17: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits des tannins des parties aériennes et des racines de la ssp *coloratus* et la ssp *eucliatius*.

Système de solvants: acétone/toluène/acide formique (30 :30 :10) (v/v/v).

Adsorbant : gel de silice.

Plantes	Spots (n °)	Rf des spots	Spots (n °)	Rf des spots
	Partie aérienne		Racine	
ssp coloratus	1	0,25	1	0,54
	2	0,33	2	0,61
	3	0,5	3	0,66
	4	0,66	4	0,83
	5	0,70		
ssp eucliatius	1	0,31	1	0,42
	2	0,38	2	0,46
	3	0,43	3	0,56
	4	0,51	4	0,62
	5	0,55	5	0,66
	6	0,61	6	0,83
	7	0,65		
	8	0,70		
	9	0,72		



Figure 47 : Chromatogramme résultant de la CCM des extraits des tanins.

Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence chez la ssp coloratus cinq spots dans la partie aérienne et quatre spots dans les racines. Concernant la ssp euciliatus ont été révélé neuf spots dans la partie aérienne et six spots dans les racines.

Le **tableau n° 18** indique les Rf des étalons utilisés à savoir le phloroglucinol, le pyrogallol, l'hydroquinone, le résorcinol et le catéchol.

Tableau 18 : Valeurs des Rf des étalons.

Système de solvant : acétone/toluène/acide formique (30 :30 :10) (v/v/v).

Etalons	Rf
Phloroglucinol	0,66
Pyrogallol	0,70
Hydroquinone	0,72
Résorcinol	0,74
Catéchol	0,76

L'identification des composés séparés dans le système choisi a donné les résultats présentés dans le **tableau n°19**.

Tableau 19 : Composés identifiés pour les deux espèces étudiées.

Plantes	Composé (Partie aérienne)	Rf	Composé (Racine)	Rf
ssp coloratus	phloroglucinol	0,66	phloroglucinol	0,66
	pyrogallol	0,70		
ssp euciliatus	pyrogallol	0,70	phloroglucinol	0,66
	l'hydroquinone	0,72		

Par comparaison des Rf des spots avec ceux des étalons, deux composés ont été mis en évidence dans la partie aérienne de la ssp coloratus, à savoir, le phloroglucinol et le pyrogallol. En plus de ces deux composés, le phloroglucinol a été révélé dans les racines de cette plante.

Concernant la ssp euciliatus ont été mis en évidence le pyrogallol et l'hydroquinone dans la partie aérienne et le phloroglucinol dans les racines.

VII.3. CCM des huiles essentielles

L'application de la CCM comme moyen d'analyse, permet la révélation de certains constituants et surtout la mise en évidence des spots majoritaires d'huile essentielle de la ssp coloratus et de la ssp euciliatus. Pour l'identification des principaux composants, nous avons utilisé deux types de détection : la lumière ultra-violette et le réactif de coloration « vanilline sulfurique à 1% » **Tableau n°20**.

➤ Pour la ssp coloratus

La détection par U.V a révélé la présence de six spots avec un spot important coloré en bleu clair et de Rf **(0,40)**.

La révélation par la vanilline sulfurique **(1%)** nous a permis de distinguer dix spots dont deux importants, l'un coloré en rose clair avec Rf de **(0,40)** et l'autre de couleur violet verdâtre avec un Rf de **(0,68)**. Ce dernier représente le composé majoritaire.

➤ En ce qui concerne la ssp euciliatus

La révélation par ultra-violet nous a permis de distinguer trois spots dont l'un est plus intense en bleu violacé avec un Rf de **(0,40)** quant à la vanilline sulfurique, elle a fait apparaître six spots dont deux importants, l'un de couleur rose de Rf **(0,40)** et l'autre de couleur violet avec un Rf de **(0,67)**.

- De ces résultats, on déduit que la ssp coloratus renferme plus de constituants par rapport à la ssp euciliatus.

- La révélation par la vanilline sulfurique reste le meilleur moyen pour l'obtention d'un maximum de séparations de composés par rapport à l'ultra-violet.

Afin de déterminer les spots les plus importants pour les deux ssp, nous avons utilisé le Thymol comme composé de référence vu sa présence comme constituant majoritaire dans presque toutes les espèces du genre *Thymus*.

Le thymol est identifié comme constituant majoritaire avec un Rf de **0,40** et de couleur rose pour la ssp *euciliatus* ; il est par contre moins intense dans la ssp *coloratus*. Cependant, nous avons constaté la présence d'un autre composé important non identifié de couleur violet verdâtre et de Rf égal à **0,68**.

Tableau : 20 Résultats de la chromatographie sur couche mince des huiles essentielles pour les deux ssp de *Thymus ciliatus*.

Sous espèce	N° de spot	Détection par l'UV (366nm)			Détection par Vanilline Sulfurique à (1%)		
		R.f	coloration	composés	R.f	coloration	composés
coloratus	1	0,22	bleu		0,15	Noir verdâtre	
	2	0,26	Bleu claire		0,20	Violet	
	3	0,40	Bleu claire	Thymol	0,25	Vert fonce	
	4	0,47	blanc		0,32	Vert claire	
	5	0,50	Bleu claire		0,40	Rose claire	Thymol
	6	0,61	Bleu gris		0,44	Marron claire	
	7				0,51	Bleu violacé	
	8				0,53	Violet	
	9				0,68	Violet verdâtre	
	10				0,73	Bleu violacé	
euciliatus	1	0,15	Bleu violacé		0,15	Violet claire	
	2	0,40	Bleu violacé	Thymol	0,18	Violet	
	3	0,47	Blanc gris		0,24	Vert	
	4				0,40	Rose	
	5				0,48	Violet claire	
	6				0,67	Violet	
Témoin Thymol	1	0,42	Bleu violacé	Thymol	0,40	Rose rouge	Thymol

VIII. Chromatographie en phase gazeuse

Pour confirmer les résultats obtenus par CCM nous avons appliqué une technique d'analyse plus efficace à l'étude de la composition chimique des huiles essentielles des deux ssp de *Thymus ciliatus*. La CPG reste la technique d'analyse la plus utilisée pour les huiles essentielles.

Deux analyses ont été effectuées pour chaque sous espèces correspondant à la maturité de la plante (pleine floraison). Le mois de Mai est juin pour la coloratus et juin, juillet pour le euciliatus.

Pour la ssp coloratus, les résultats des chromatogrammes sont présentés dans les **tableaux (21,22)**.

L'analyse de l'huile essentielle du mois de Mai nous a révélé 63 pics dont 4 pics importants de pourcentage variant de **11,56%** à **20,18%** et d'autres moins importants variant de **1,27%** à **7,88%**.

Celui du mois de Juin nous a révélé 60 pics dont 2 pics de pourcentage important (**11,27%**) et (**18,39%**), et d'autres composés varient de **1,12%** à **8,95%**.

En ce qui concerne la ssp euciliatus, les résultats de chromatogrammes sont présentés dans le **tableau (23)**.

Le mois de Juin nous a révélé 50 pics dont 1 pic très important présentant un pourcentage de **76,25%** avec la présence de certains pics moins importants de pourcentage variant de **1,07%** à **6,45%**.

Le chromatogramme du moi de Juillet nous a révélé 39 pics avec un pic majoritaire de **75,70%** et d'autres pics de pourcentages très faible de **1,08%** à **6,65%**.

De ces résultats obtenus par CPG, l'huile essentielle de la ssp coloratus reste toujours riche en composés par rapport à la ssp euciliatus, et que le Thymol est le composé majoritaire de la ssp euciliatus par contre, il est présent dans la sous espèce coloratus avec un pourcentage de **12,30%** au mois de Mai et **3,37%** au mois de Juin.

Ceci confirme réellement les résultats d'analyse obtenus par CCM.

Tableau 21 : Compositions chimiques de l'huile essentielle de la ssp coloratus (Mai).

N° de pic	R.T (min)	%	Composés	N° de pic	R.T (min)	%	Composés
1	3,224	7,07 10 ⁻²		33	30,846	3,46 10 ⁻¹	
2	5,252	3,4310 ⁻²		34	31,733	3,99 10 ⁻¹	
3	5,916	2,92 10 ⁻²		35	32,698	2,34 10 ⁻²	
4	7,806	7,18 10 ⁻²		36	33,840	8,64 10 ⁻¹	
5	11,325	6,49 10 ⁻²		37	34,470	1,27	X ₁₀
6	11,846	2,97	X ₁	38	35,726	12,3	Thymol
7	12,781	6,34	X ₂	39	37,517	5,97 10 ⁻²	
8	13,902	2,12 10 ⁻¹		40	37,910	7,99 10 ⁻²	
9	14,208	2,14	X ₃	41	39,203	2,47 10 ⁻²	
10	15,137	13,2	X ₄	42	39,637	3,44 10 ⁻¹	
11	15,691	4,20 10 ⁻²		43	40,222	3,12 10 ⁻¹	
12	16,403	2,79 10 ⁻¹		44	40,480	1,64 10 ⁻¹	
13	17,155	9,53 10 ⁻¹		45	40,919	4,29 10 ⁻²	
14	17,643	7,88	X ₅	46	41,427	5,37 10 ⁻²	
15	18,346	1,94	X ₆	47	41,703	1,63 10 ⁻¹	
16	19,024	4,93 10 ⁻¹		48	42,487	1,40	X ₁₁
17	19,676	2,87 10 ⁻¹		49	42,848	9,52 10 ⁻²	
18	20,530	1,17 10 ⁻¹		50	43,115	6,04 10 ⁻²	
19	20,855	3,85 10 ⁻¹		51	43,498	4,67 10 ⁻²	
20	21,257	2,70 10 ⁻²		52	43,740	6,13 10 ⁻²	
21	21,927	4,97	X ₇	53	44,286	2,19 10 ⁻¹	
22	23,306	1,11 10 ⁻¹		54	44,851	1,37 10 ⁻¹	
23	23,265	1,33 10 ⁻¹		55	45,109	3,76 10 ⁻²	
24	25,234	11,56	X ₈	56	46,159	1,69	X ₁₂
25	25,845	1,66.10 ⁻¹		57	46,455	3,17 10 ⁻²	
26	27,203	20,18	X ₉	58	46,883	1,29 10 ⁻¹	
27	27,706	1,34 10 ⁻¹		59	47,738	2,05	X ₁₃
28	28,249	7,43 10 ⁻¹		60	47,997	8,87 10 ⁻²	
29	28,665	1,38 10 ⁻¹		61	48,590	3,27 10 ⁻¹	
30	28,973	3,68 10 ⁻²		62	49,228	4,34 10 ⁻²	
31	30,158	3,14 10 ⁻¹		63	49,903	9,63 10 ⁻²	
32	30,557	2,6110 ⁻¹					

Tableau 22 : Compositions chimiques de l'huile essentielle de la ssp coloratus (Juin).

N° de pic	R.T (min)	%	Composés	N° de pic	R.T (min)	%	Composés
1	-1,80	5,10		31	-27,262	18,39	X ₁₃
2	-4,802	3,27 10 ⁻²		32	-27,768	7,63	X ₁₄
3	-5,177	8,37 10 ⁻²		33	-28,110	4,83 10 ⁻¹	
4	-5,630	7,65 10 ⁻²		34	28,505	1,81	X ₁₅
5	-6,323	8,18 10 ⁻¹		35	-28,985	2,08 10 ⁻¹	
6	-7,427	2,11	X ₁	36	-29,263	1,38 10 ⁻¹	
7	-9,990	7,87 10 ⁻¹		37	-29,860	2,97 10 ⁻¹	
8	-10,619	1,25 10 ⁻¹		38	30,400	4,40 10 ⁻¹	
9	-11,657	4,99	X ₂	39	-30,728	3,97 10 ⁻¹	
10	-12,768	1,94	X ₃	40	-31,021	4,91 10 ⁻¹	
11	-13,296	5,81 10 ⁻²		41	-31,448	2,41 10 ⁻¹	
12	-14,225	1,60	X ₄	42	-31,891	1,07 10 ⁻²	
13	-14,904	5,52	X ₅	43	-32,610	6,73 10 ⁻²	
14	-15,438	1,23 10 ⁻¹		44	-33,097	3,60 10 ⁻²	
15	-16,065	5,83 10 ⁻¹		45	-33,747	1,18	X ₁₆
16	-16,445	8,36 10 ⁻²		46	-34,705	6,49 10 ⁻²	
17	-17,095	1,80 10 ⁻¹		47	-35,549	3,37	Thymol
18	-17,730	3,83	X ₆	48	-37,635	7,34 10 ⁻²	
19	-18,445	2,18	X ₇	49	-37,913	7,07 10 ⁻²	
20	-18,721	3,99 10 ⁻²		50	-38,204	1,09 10 ⁻²	
21	-19,090	3,05 10 ⁻¹		51	-38,659	2,14 10 ⁻²	
22	-19,403	3,55		52	-39,479	6,17 10 ⁻¹	
23	-19,711	1,11 10 ⁻²		53	-40,092	3,06 10 ⁻¹	
24	-20,148	1,12	X ₈	54	-40,316	4,92 10 ⁻¹	
25	-20,891	2,20	X ₉	55	-40,981	3,90 10 ⁻²	
26	-21,806	1,78 10 ⁻¹		56	-41,569	1,92 10 ⁻¹	
27	-22,590	2,74	X ₁₀	57	-42,605	2,31	X ₁₇
28	-24,296	8,95	X ₁₁	58	-43,668	6,11 10 ⁻²	
29	-24,930	2,54 10 ⁻²		59	-44,287	2,27 10 ⁻²	
30	-25,70	11,27	X ₁₂	60	-44,820	3,24 10 ⁻²	

Tableau 23: Composition chimique de l'huile essentielle de la ssp euciliatus (Juin) et (juillet).

N° de pic	R.T (mn)	% Juin	composés	N° de pics	R.T	% Juin (suite)	composés	N° de pic	R.T (mn)	% Juillet	composés
1	-5,240	5,89 10 ⁻²		40	-42,452	1,88 10 ⁻¹		1	5,240	1,29 10 ⁻¹	
2	-7,942	5,19 10 ⁻²		41	-42,774	3,90 10 ⁻¹		2	7,445	2,95 10 ⁻²	
3	-11,252	2,08 10 ⁻¹		42	-43,480	4,19 10 ⁻¹		3	9,693	1,85 10 ⁻²	
4	-11,655	1,21 10 ⁻¹		43	-44,364	2,19 10 ⁻¹		4	10,965	5,21 10 ⁻²	
5	-12,466	7,04 10 ⁻²		44	-45,232	3,43 10 ⁻¹		5	11,348	1,10	X ₁
6	-14,027	2,97 10 ⁻¹		45	-45,953	9,17 10 ⁻²		6	11,732	5,83 10 ⁻¹	
7	-14,658	4,94 10 ⁻¹		46	-45,427	8,43 10 ⁻²		7	12,495	1,35 10 ⁻¹	
8	-15,087	6,21 10 ⁻²		47	-46,775	7,18 10 ⁻²		8	14,056	5,01 10 ⁻¹	
9	-15,322	3,97 10 ⁻¹		48	-47,466	1,68 10 ⁻¹		9	14,811	1,74	X ₂
10	-15,905	6,69 10 ⁻²		49	-48,492	8,84 10 ⁻²		10	15,049	5,17 10 ⁻²	
11	-16,284	3,56 10 ⁻²		50	-49,738	9,14 10 ⁻²		11	15,604	1,72 10 ⁻¹	
12	-16,825	6,45	X ₁					12	15,955	4,79 10 ⁻²	
13	-17,060	4,15 10 ⁻¹						13	16,431	1,25	X ₃
14	-18,952	1,48	X ₂					14	17,236	6,65	X ₄
15	-19,585	4,92 10 ⁻¹						15	18,200	6,19 10 ⁻²	
16	-20,785	5,99 10 ⁻²						16	19,371	6,45	X ₅
17	-21,597	1,60	X ₃					17	19,712	3,69 10 ⁻¹	
18	-23,180	1,82 10 ⁻¹						18	20,843	1,19 10 ⁻¹	
19	-24,069	3,77 10 ⁻²						19	21,193	2,92 10 ⁻²	
20	-24,473	2,63 10 ⁻¹						20	21,786	1,60	X ₆
21	-24,471	2,48 10 ⁻¹						21	23,084	5,78 10 ⁻²	
22	-25,320	1,50 10 ⁻¹						22	24,489	2,52 10 ⁻²	
23	-25,781	1,27 10 ⁻¹						23	24,761	4,27 10 ⁻²	
24	-26,248	4,60 10 ⁻¹						24	26,155	2,69 10 ⁻¹	
25	-26,860	1,07	X ₄					25	26,826	7,03 10 ⁻¹	
26	-27,894	2,21 10 ⁻¹						26	27,728	3,05 10 ⁻¹	
27	-29,294	2,40	X ₅					27	29,061	1,43 10 ⁻¹	
28	-30,230	1,74 10 ⁻¹						28	30,165	7,21 10 ⁻²	
29	-30,847	2,06 10 ⁻¹						29	30,932	7,27 10 ⁻²	
30	-32,289	1,49 10 ⁻¹						30	31,930	6,35 10 ⁻²	
31	-33,050	2,56 10 ⁻¹						31	32,647	5,17 10 ⁻²	
32	-33,795	3,04 10 ⁻¹						32	37,708	75,70	Thymol
33	-36,470	76,25	Thymol					33	39,795	1,11 10 ⁻¹	
34	-37,795	1,62 10 ⁻¹						34	40,381	1,42 10 ⁻²	
35	-38,780	7,30 10 ⁻²						35	40,901	6,63 10 ⁻²	
36	-39,341	5,04 10 ⁻¹						36	42,733	1,08	X ₇
37	-39,875	8,46 10 ⁻²						37	43,296	1,57 10 ⁻²	
38	-40,425	3,78 10 ⁻²						38	44,576	4,73 10 ⁻²	
39	-40,560	6,89 10 ⁻²						39	44,865	2,82 10 ⁻²	

IX. Etude de l'activité antioxydante

Les consommateurs considèrent plus surs et plus sains les produits élaborés à partir des ingrédients naturels rejetant les additifs synthétiques. Cette situation justifie l'intérêt pour l'identification des nouvelles substances naturelles capables d'être utilisées comme ingrédients alimentaires. Sur la base de nombreuses études réalisées, les antioxydants naturels (extraits d'herbe) sont apparus comme une alternative aux antioxydants de synthèses qui sont de moins en moins utilisés dans les denrées alimentaires. L'activité inhibitrice des extraits d'herbes est attribuée fondamentalement à sa richesse en composés phénoliques.

Différents extraits de plantes aromatiques tels que l'extrait de sauge, de thym, d'origan, de moutarde... sont des sources potentielles de composants chimiques naturels responsables d'activité antioxydante. A cet effet, plusieurs essais ont été menés par certains auteurs pour tester l'activité antioxydante de ces différents extraits (**Fasseas et al., 2007** ; **Bouzouita et al., 2008** ; **Misharina et al., 2008** ; **Lefsih et al., 2010**).

C'est dans ce contexte que nous avons évalué l'activité antioxydante des extraits de la partie aérienne et des racines des deux ssp espèces aromatiques de même famille à savoir la ssp coloratus et la ssp euciliatus par quatre méthodes différentes en l'occurrence la réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*), le piégeage du radical libre DPPH^{*} (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), le piégeage du peroxyde d'hydrogène (*H₂O₂ scavenging activity*) et l'activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta carotène (**Wong, Leong et Koh, 2006**) afin de tester et de localiser l'extrait le plus actif de chaque partie de la plante étudiée.

Les composés testés par ces méthodes sont :

- ◆ L'extrait brut des racines et de la partie aérienne.
- ◆ Les deux fractions de flavonoïde acétate d'éthyle et n-butanol des racines et de la partie aérienne
- ◆ Les tanins des racines et de la partie aérienne.

L'acide ascorbique et le BHA sont connus pour leurs propriétés antioxydantes et sont utilisés comme contrôles positifs.

IX.1. Réduction du Fer : FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . La puissance de réduction est un des mécanismes antioxydants (Karagozler *et al.*, 2008).

Dans notre travail, nous avons opté pour tester les différents extraits de chaque partie pour les deux plantes étudiées. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans les figures nous ont montré que la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons (Ozturk *et al.*, 2007 ; Su *et al.*, 2008 ; Liuk *et al.*, 2009).

IX.1.1. Réduction du Fer pour la ssp coloratus

❖ Extraits bruts

Nous remarquons sur les graphes de la **figure n° 48**, que l'extrait brut de la partie aérienne a présenté le plus d'activité pour réduire le fer par rapport à celle de la partie racine, reflété par les densités optiques obtenues à différentes concentration (DO maximale = 0,810 à la concentration de 1,25mg/mL), même plus importante que celle des antioxydants de référence à savoir l'acide ascorbique et le BHA (DO = 0,710 ; DO= 0,745) respectivement pour la même concentration 1,25mg/mL.

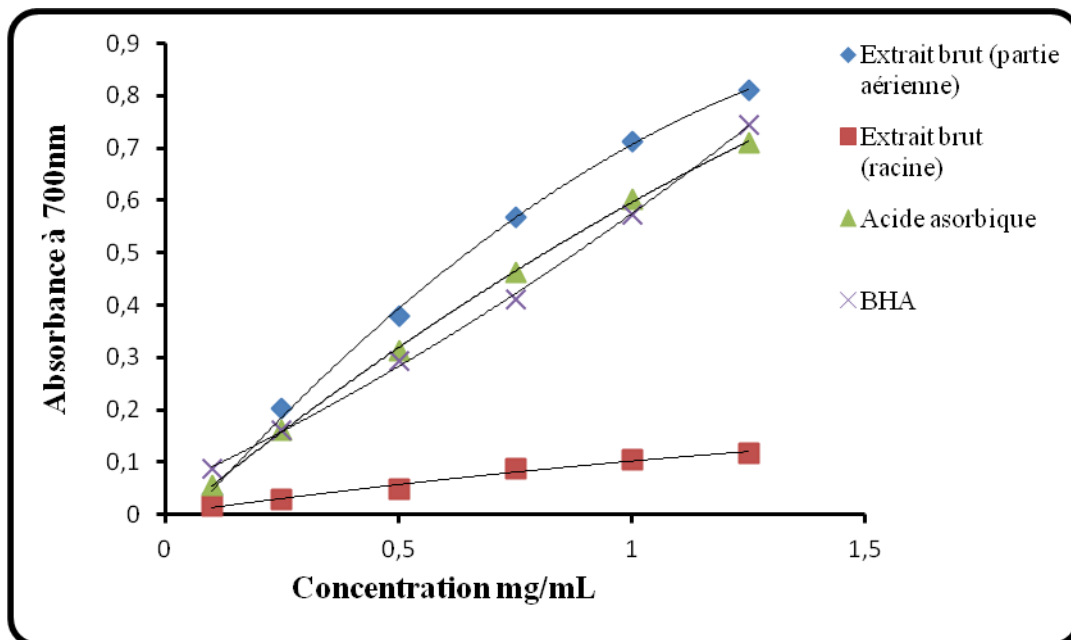


Figure 48: Pouvoirs réducteurs des extraits bruts, de BHA et de l'acide ascorbique.

❖ Flavonoïdes

Nous remarquons sur les graphes de la **figure n°49** et la **figure n°50**, que la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne de la ssp coloratus a présenté une activité beaucoup plus prononcée pour réduire le fer par rapport aux autres fractions et, que la fraction butanolique de la partie aérienne montre un effet moins prononcée vis –à-vis de la réduction du fer. En effet la fraction acétate d'éthyle et la fraction butanolique de la partie racine ont présenté une très faible activité, observée par des valeurs de densités optique égale à **0,318** et **0,091** respectivement pour une concentration de 1,25mg/mL. Nous remarquons clairement que l'acide ascorbique et le BHA exercent une activité remarquable pour réduire le fer, reflétée par les densités optiques élevées obtenues à différentes concentrations pour ce dernier.

Fraction d'acétate d'éthyle

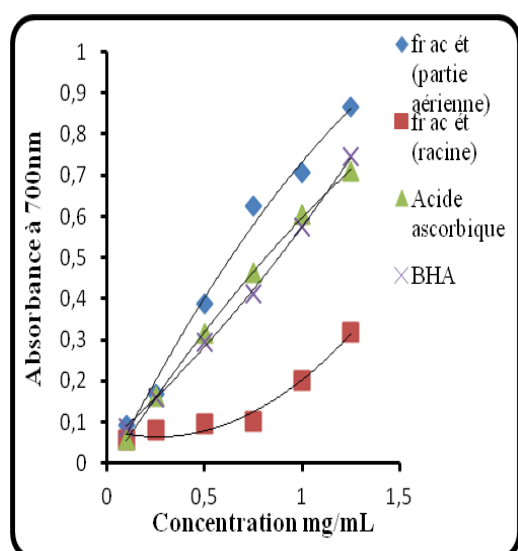


Figure49 : Pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction AcOEt), l'acide ascorbique, et le BHA

Fraction butanolique

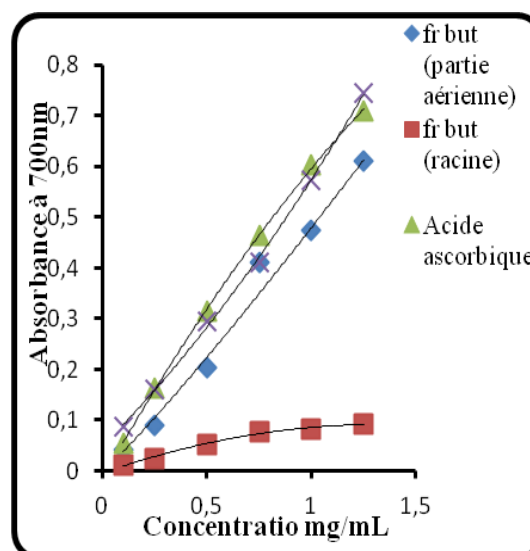


Figure50 : Pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction n-buOH), l'acide ascorbique, et le BHA.

❖ Tanins

Les graphes illustrés dans la **figure n°51** montrent que les tanins de la partie aérienne ont présenté le plus d'activité pour réduire le fer par rapport à celle de l'acide ascorbique et le BHA. Nous remarquons aussi, que la partie racine a présenté une très faible activité pour réduire le fer au vu des valeurs de densité optiques (DO) qui ne dépassent pas **0,3**. Alors que les témoins positifs fournissent des DO égales à **0,710** pour l'acide ascorbique et **0,745** pour le BHA.

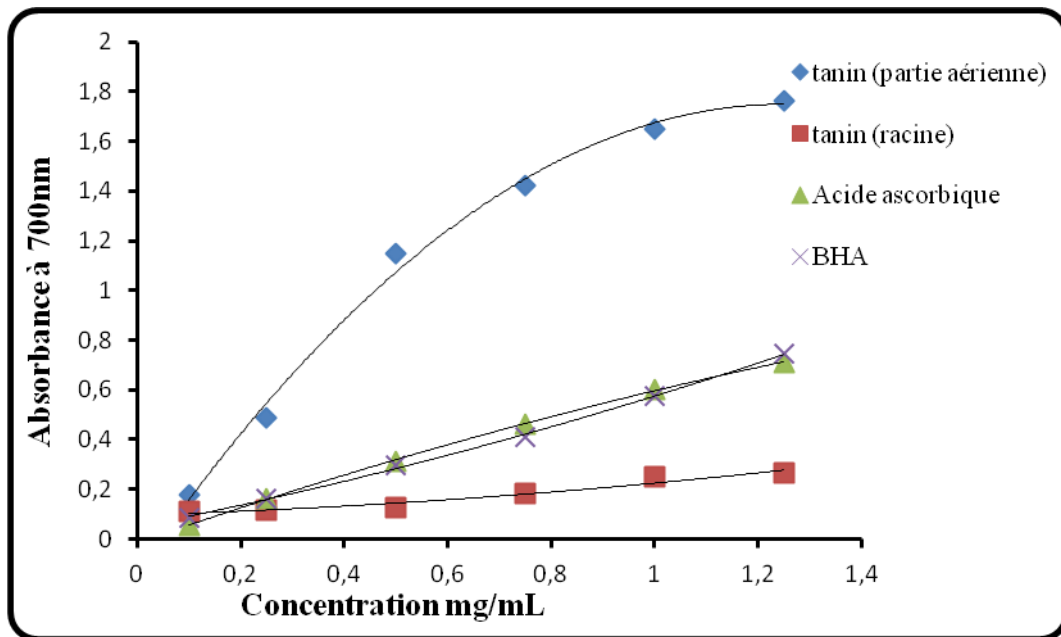
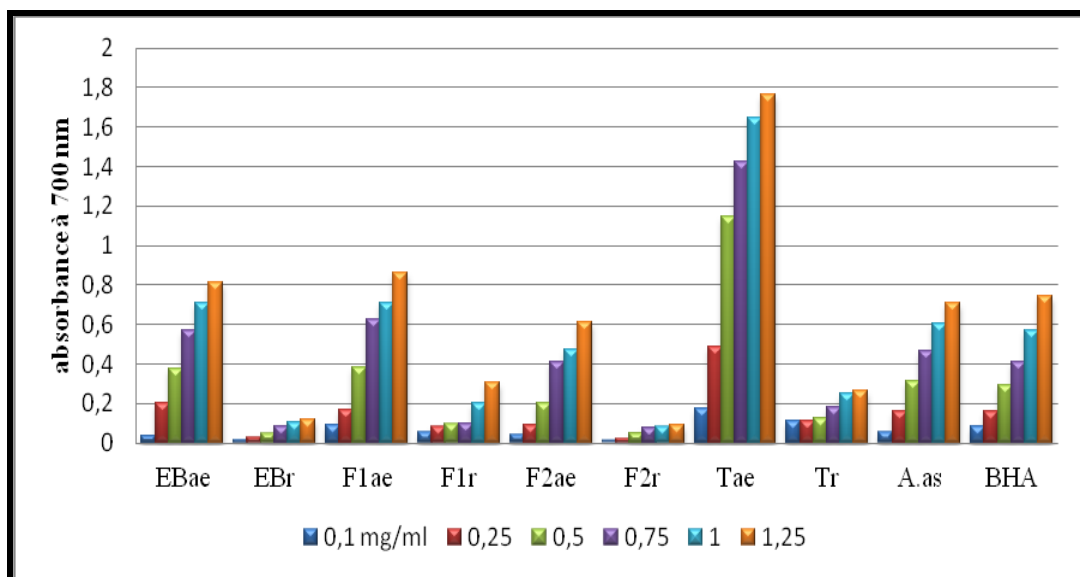


Figure 51 : Pouvoirs réducteurs des tanins, de BHA et de l'acide ascorbique.

La **figure n°52** montre une comparaison générale sous forme d'histogrammes des résultats obtenus pour tous les extraits des deux parties des plantes étudiées et ceux de l'acide ascorbique et du BHA.



A.as: Acide Ascorbique

EBae : Extrait Brut (partie aérienne)

F1ae : Fraction d'acétate d'éthyle (partie aérienne)

F2ae : Fraction Butanoliques (partie aérienne)

Tae : Tanin (partie aérienne)

BHA : butylhydroxyanisole

EBr : Extrait Brut (Racines)

F1r : Fraction d'acétate d'éthyle (Racines)

F2r : Fraction Butanolique des Racines

Tr : Tanin (Racines)

Figure 52: Pouvoir réducteur de tous les extraits de la ssp coloratus.

En général, pour les deux parties de la plante étudiée, le profil de réduction du fer augmente avec une élévation des concentrations utilisées. Cette augmentation est plus marquée dans le cas des extraits de la partie aérienne.

Nous remarquons qu'à la concentration de 1,25 mg/ml, l'extrait de tanins de la partie aérienne, la fraction d'acétate d'éthyle et l'extrait brut présentent les activités les plus élevées pour réduire le fer comparativement à celles de l'acide ascorbique et du BHA (dans l'ordre DO= 1,764 - DO= 0,865 - DO = 0,809 - DO= 0,710 - DO= 0,745).

La fraction n-butanol de la partie aérienne de la même plante présente une activité réductrice de fer plus ou moins similaire à celles de l'acide ascorbique et du BHA à la concentration de 1,25 mg/mL (DO= 0,610 pour la fraction butanolique, DO= 0,710 pour l'acide ascorbique et DO = 0,745 pour le BHA).

L'activité la plus faible est remarquée chez les extraits des parties racines de la ssp coloratus observée par des DO qui ne dépassent pas 0,4 à la même concentration.

Nous pouvons classer la puissance de réduction du fer des différents extraits pour les deux parties de la plante étudiée à la concentration de 1,25 mg/ml comme suit :

***Partie aérienne :**

tanins › fractions d'acétate d'éthyle › extraits bruts › BHA › acide ascorbique › fraction butanolique.

***Racines :**

Fraction acétate d'éthyle › tanins › Extraits brut › fraction butanolique.

De ce classement, nous pouvons conclure que les tanins des parties aériennes montrent une capacité très élevée à réduire le fer comparativement à la fraction d'acétate d'éthyle, à la fraction butanolique et de l'extrait brut.

IX.1.2. Réduction du Fer pour la ssp eucliatius

❖ **Extrait brut**

Nous remarquons sur les graphes de la figure n°53 que l'extrait brut pour les deux parties étudiées de la ssp eucliatius présente des activités prononcées vis-à-vis de la réduction du fer et de celles des antioxydants de référence, l'acide ascorbique et le BHA.

En effet, la partie aérienne montre l'activité la plus élevée pour réduire le fer avec une DO maximale égale à **0,817** à la concentration de 1,25 mg/ml par rapport à la partie racine dont la densité optique est de **0,765** pour la même concentration.

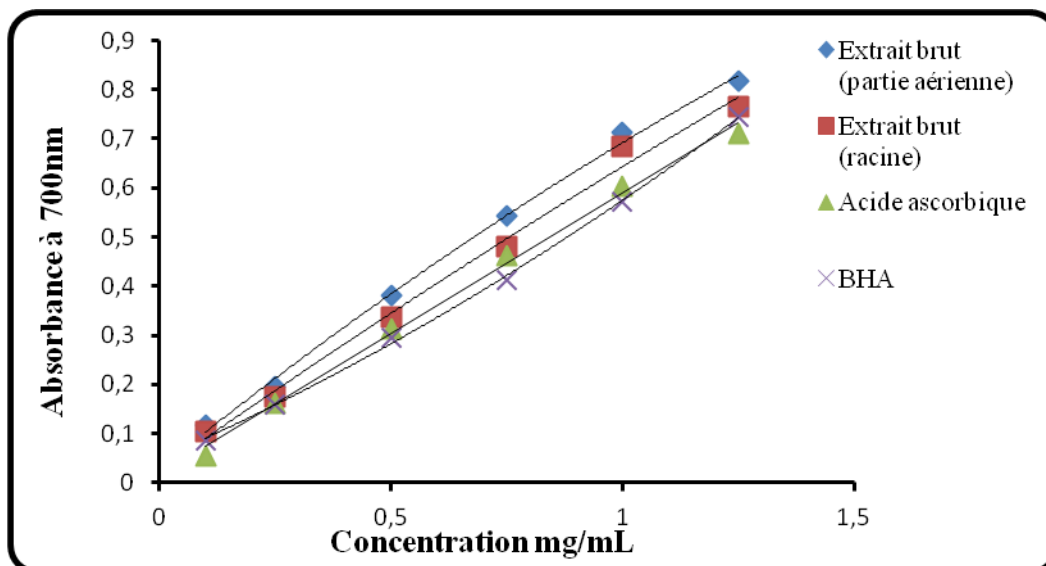


Figure 53 : Pouvoirs réducteurs des extraits bruts, de BHA et de l'acide ascorbique.

❖ Flavonoïde

La **figure n°54** montre que la fraction d'acétate d'éthyle de la partie racine de la ssp *euciliatus* présente plus d'activité pour réduire le fer par rapport à la partie aérienne et montre également une activité similaire à celles de l'acide ascorbique et du BHA à des concentrations comprises entre 0,1 mg/mL et 0,5 mg/mL. Au-delà de ces concentrations, l'activité de cet extrait augmente légèrement par rapport à cette référence.

En revanche, la **figure n° 55** présente le contraire concernant la fraction butanolique qui, pour la partie aérienne, montre plus d'activité pour réduire le fer par rapport à la partie racine. Cette activité est plus marquée que celles des témoin positifs (acide ascorbique et BHA).

Fraction d'acétate d'éthyle

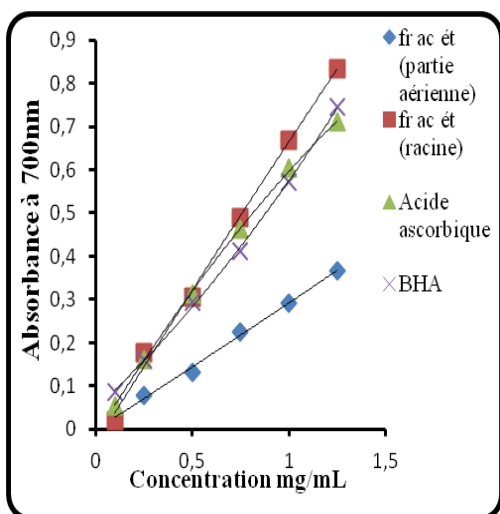


Figure 54 : Pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction AcOEt), l'acide ascorbique, et le BHA.

Fractions butanoliques

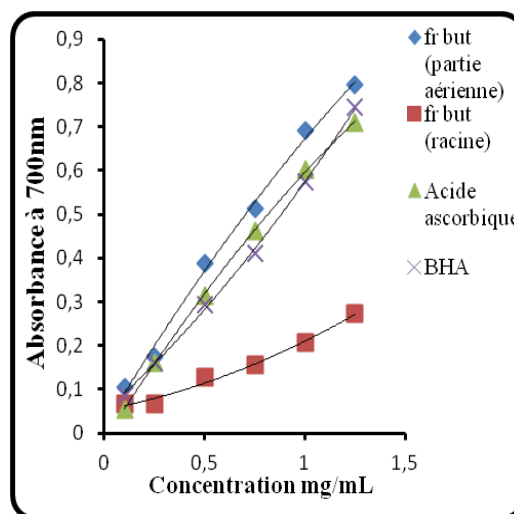


Figure 55: pouvoirs réducteurs des flavonoïdes (fraction n-BuOH), l'acide ascorbique et le BHA.

❖ Tanin

L'extrait des tanins pour les deux parties étudiées de la ssp *eucliliatus* a présenté l'activité la plus élevée pour réduire le fer par rapport aux antioxydants standards l'acide ascorbique et le BHA, représentés par des densités optiques élevées obtenues à différentes concentrations. A la concentration de 1mg/mL, la densité optique est de l'ordre de **1,992** pour la partie aérienne et de **1,278** pour la partie racine.

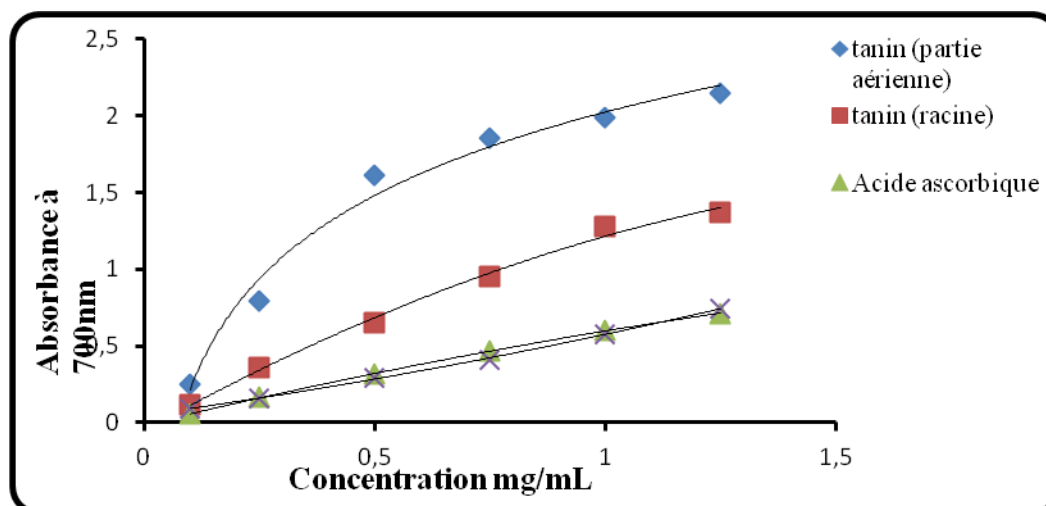
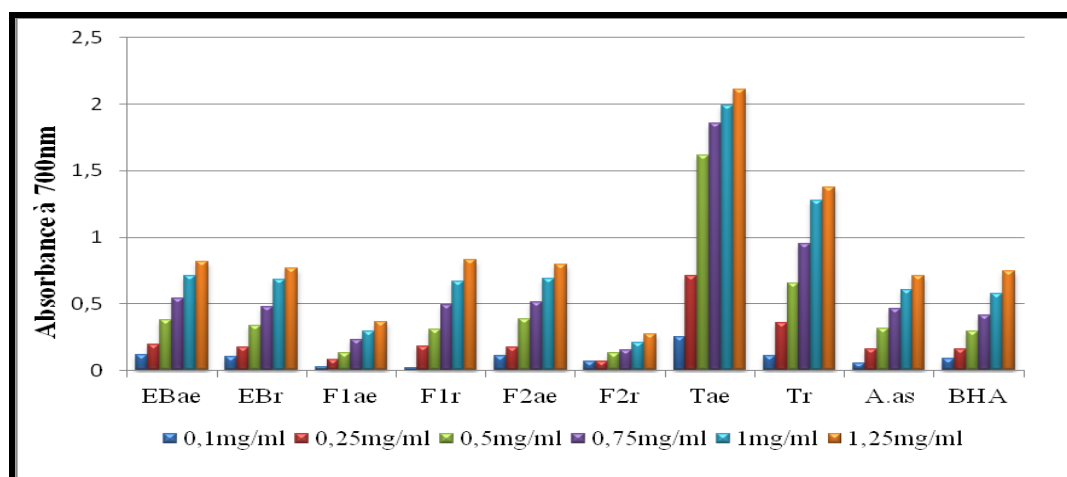


Figure 56: Pouvoirs réducteurs des tanins, de BHA et de l'acide ascorbique.

Les pouvoirs réducteurs de tous les extraits bruts, flavoniques et tanins pour les deux parties des deux plantes étudiées sont représentés dans l'histogramme de la **figure n°57**.



A.as: Acide Ascorbique

EBae : Extrait Brut (partie aérienne)

F1ae : Fraction d'acétate d'éthyle (partie aérienne)

F2ae : Fraction Butanoliques (partie aérienne)

Tae : Tanin (partie aérienne)

BHA : butylhydroxyanisole

EBr : Extrait Brut (Racines)

F1r : Fraction d'acétate d'éthyle (Racines)

F2r : Fraction Butanolique des Racines

Tr : Tanin (Racines)

Figure 57: Pouvoir réducteur de tous les extraits de la ssp *eucliliatus*.

La **figure n° 57** montre que la capacité à réduire le fer est variable entre les différentes parties de la plante étudiée.

Nous remarquons qu'à une concentration de 1,25 mg/mL, les tanins pour les deux parties de la plante étudiée présentent l'activité la plus élevée pour réduire le fer comparativement à celles de l'acide ascorbique et du BHA (DO = 2,150 pour les tanins de la partie aérienne, DO= 1,374 pour les tanins des racines, DO= 0,710 pour l'acide ascorbique, DO= 0,745 pour le BHA) suivi par l'extrait brut, la fraction n butanol de la partie aérienne et la fraction acétate d'éthyl des racines dans l'ordre DO=0,817, DO= 0,795, DO = 0,833. L'activité la plus faible est remarquée chez l'extrait brut et la fraction butanolique des racines et la fraction acétate d'éthyl de la partie aérienne.

Le classement de la puissance de réduction de fer des différentes extraits peut être établi comme suit : Tanins de la partie aérienne > Tanins des racines > Extrait brut de la partie aérienne > Fraction acétate d'éthyles des racines > n-butanol de la partie aérienne > Extrait brut des racines > BHA > Acide ascorbique > Fraction d'acétate d'éthyle des parties aérienne > n-butanol des racines.

IX.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1- picrylhydrazyl)

Puisque le principal mécanisme d'action antioxydante des polyphénols des végétaux est le piégeage des radicaux libres, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des végétaux par le piégeage de radicaux libres synthétiques en solution dans des solvants polaires comme le méthanol à température ambiante. Les radicaux les plus fréquemment utilisés incluent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et l'acide 2,2-O-azino-bis (3-ethylbenzoline-6-sulphonique) (ABTS).

Dans cette étude, la méthode par le DPPH est choisie pour évaluer l'activité antioxydante des extraits pour les deux parties de nos plantes car cette dernière est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical (**Bozin et al., 2008**).

L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH à 515 nm qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants (AH) donateurs d'hydrogènes présents dans l'extrait végétal ou par une autre espèce radicalaire comme le montre les équations suivantes (**Paixão et al., 2007 ; Maisuthisakul et al., 2007 ; Da Silva Pinto, 2008**) :

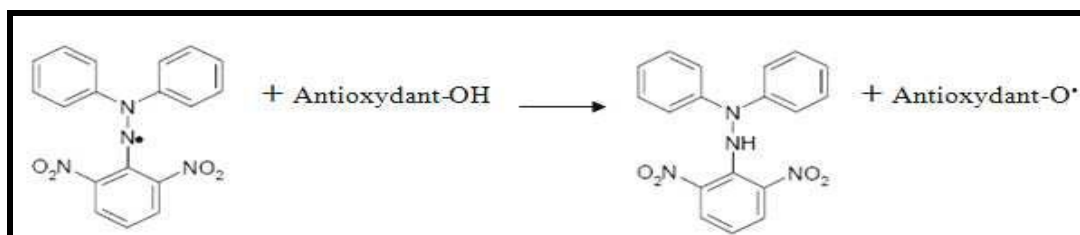
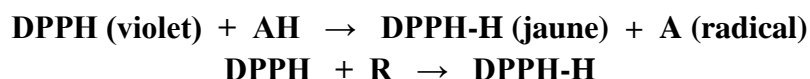


Figure 58: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Par des dilutions en cascade des différents composés à tester ainsi que des substances de référence (acide ascorbique et BHA), nous obtenons une gamme de concentrations. Pour chacune d'elles nous mesurons les densités optiques à 515 nm et, les valeurs obtenues permettent de tracer des courbes à partir desquelles nous pouvons déterminer le % de DPPH restant et la valeur de l'IC₅₀.

Les figures suivantes rapportent les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des différentes concentrations utilisées en extrait, en acide ascorbique et en BHA. Elles montrent que les pourcentages d'inhibition sont importants à différentes concentrations ; ce qui reflète la présence des composés qui peuvent réduire le radical DPPH.

IX.2.1. Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH pour les substances de référence

A des fins comparatives, deux antioxydants standards sont utilisés : l'acide ascorbique et le BHA. Ils ont montré que l'activité antioxydante est importante présentant des IC₅₀ respectivement de l'ordre de **1,12 mg/mL** et **1,61 mg/mL**.

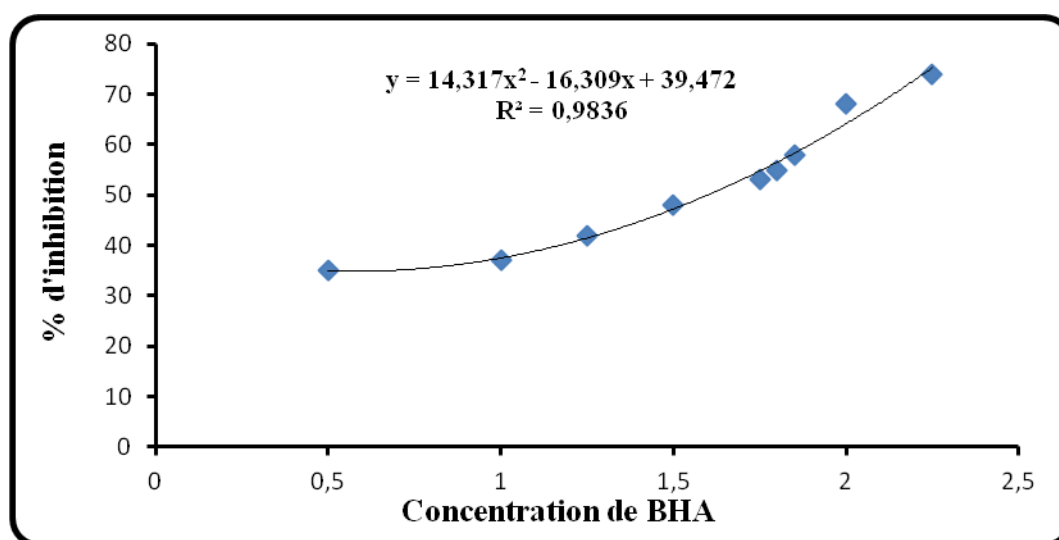


Figure 59 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour le BHA.

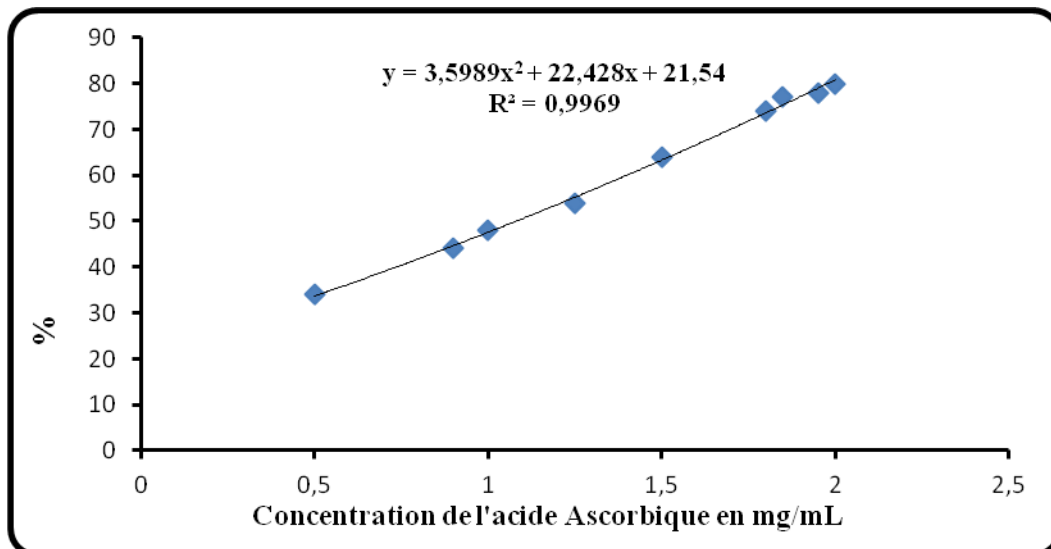


Figure 60: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour l'acide ascorbique.

IX.2.2. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour la ssp coloratus

❖ L'extrait brut

L'extrait brut de la partie aérienne a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH très important avec un pourcentage d'inhibition élevé à de faibles concentrations à la différence de l'extrait brut des racines qui présente des pourcentages d'inhibition faibles.

Une concentration de 2,5 mg/mL de l'extrait de la partie aérienne produit un pourcentage d'inhibition de 94% alors qu'une concentration de 6,5 mg/mL d'extrait des racines ne produit qu'un pourcentage d'inhibition égal à 56%.

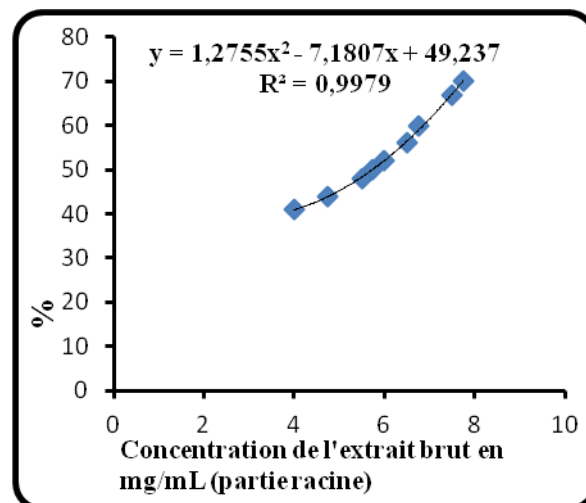
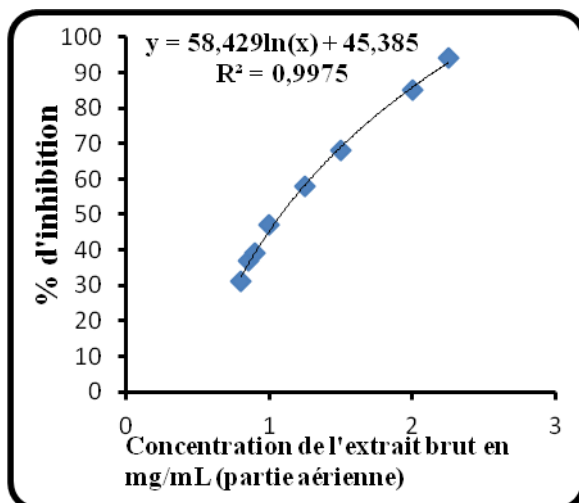


Figure 61: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts des deux parties étudiées de la ssp coloratus.

❖ Flavonoïde (Fraction d'acétate d'éthyle)

Pour la phase d'acétate d'éthyle, l'extrait de la partie aérienne a révélé une activité de piégeage du DPPH plus élevée par rapport à celle des racines avec un pourcentage

d'inhibition de l'ordre de 94% à une concentration de 1,5 mg/mL contre 71% à une concentration de 6 mg/ml pour les racines.

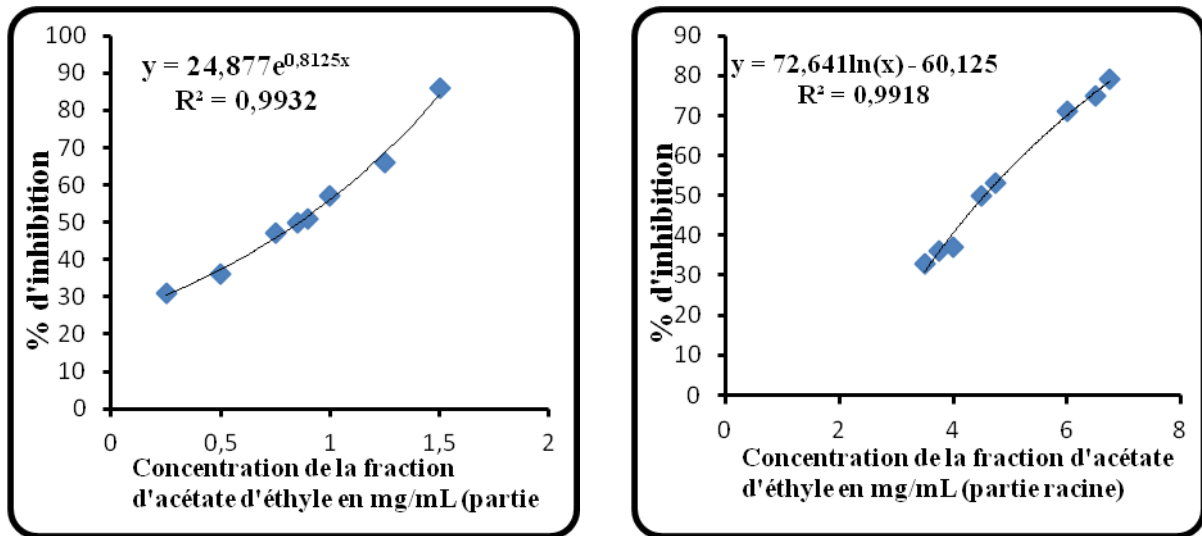


Figure 62 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions d'acétate d'éthyle de deux parties étudiées de la ssp coloratus.

❖ **Flavonoïde (Fraction butanolique)**

Pour la fraction butanolique, le meilleur résultat obtenu est celui de la fraction butanolique des parties aériennes qui a donné un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 73% à une concentration de 2,75 mg/mL. Pour les racines une concentration de 6,95 mg/mL produit un pourcentage d'inhibition de l'ordre 58%.

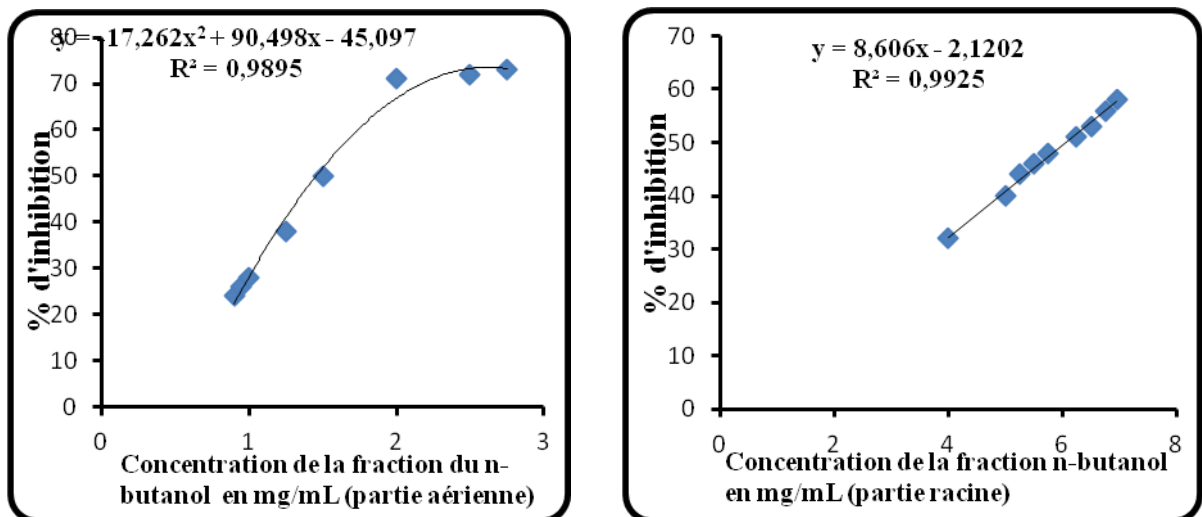


Figure 63 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de deux parties étudiées de la ssp coloratus.

❖ Tanins

Dans le cas des tanins, la partie aérienne présente une activité plus intéressante de piégeage du radical libre DPPH que celle des racines du fait qu'à de très faibles concentrations, les pourcentages d'inhibition obtenus sont très élevés. En effet, une concentration de l'ordre de 0,70 mg/mL produit un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 73% et, de 60% pour les racines à une concentration de 5mg/mL.

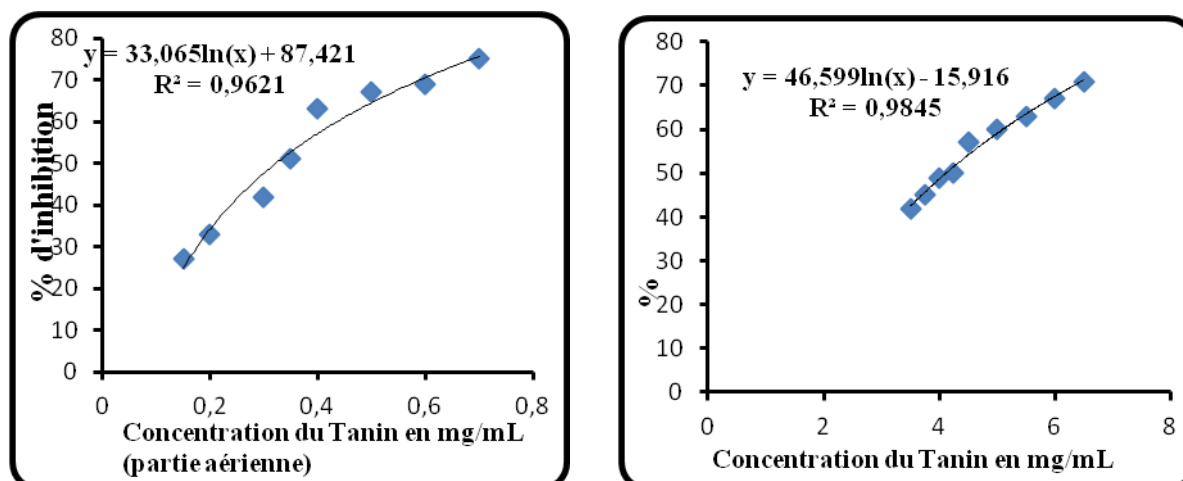


Figure 64 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les tannins de deux parties étudiées de la ssp coloratus.

IX.2.3. Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH pour la ssp euciliatus

❖ L'extrait brut

Au vu de la figure ci-dessous, nous constatons que l'extrait brut de la partie aérienne présente une activité de piégeage du radical libre DPPH plus importante que celle de l'extrait brut des racines et que, l'extrait brut de la ssp euciliatus pour les deux parties atteint 50% d'activité à des concentrations inférieures à 2 mg/mL.

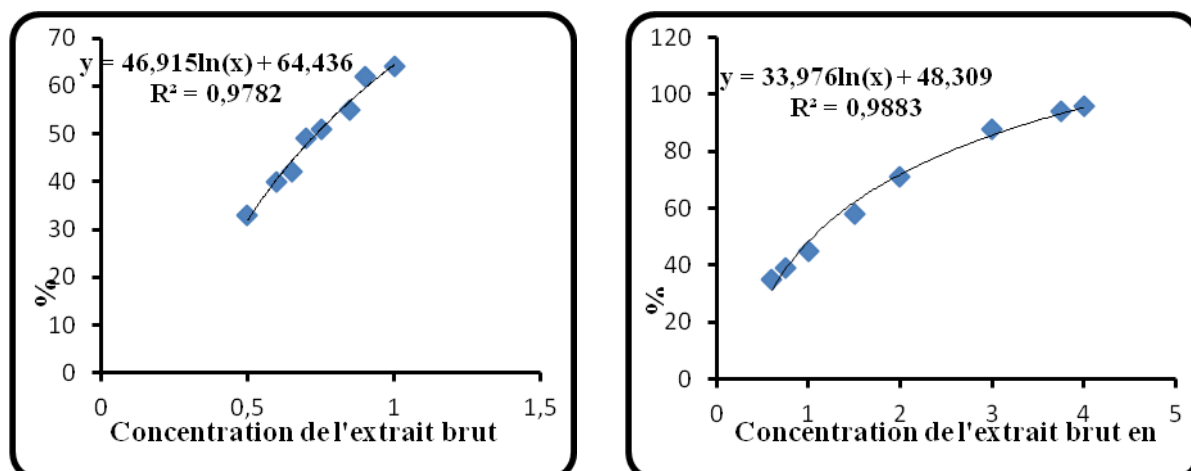


Figure 65 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits bruts de deux parties étudiées de la ssp euciliatus.

❖ Flavonoïde (Fraction d'acétate d'éthyle)

La fraction d'acétate d'éthyle des racines a révélé un pouvoir de piégeage de DPPH important par rapport à la fraction d'acétate d'éthyle de la partie aérienne du fait que l'extrait des racines a présenté, à de très faibles concentrations, des pourcentages d'inhibition très élevés. En effet, une concentration de l'ordre 1,5 mg/mL produit un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 78% pour les racines et, 60% à une concentration de 4 mg/mL pour la partie aérienne.

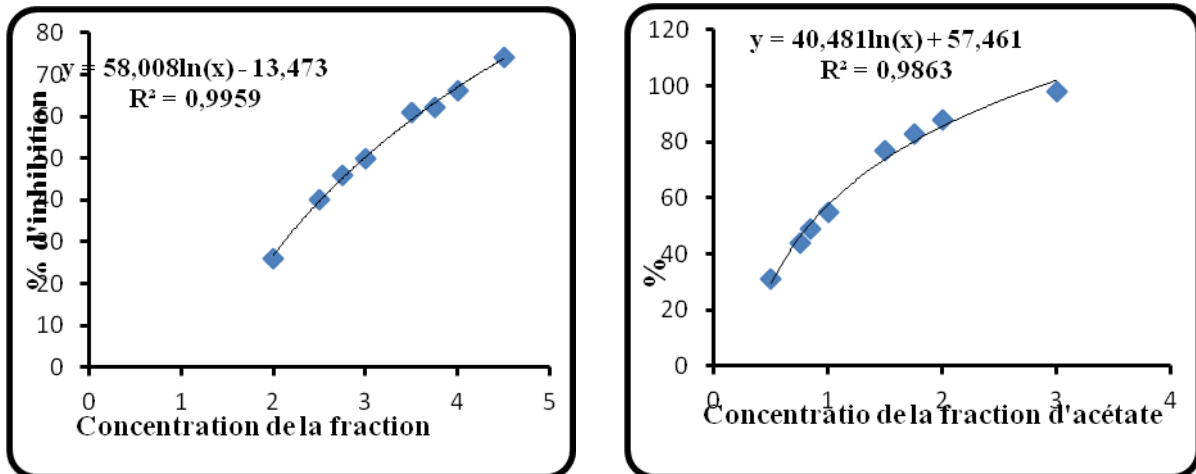


Figure 66 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions d'acétate d'éthyle de deux parties étudiées de la ssp euciliatus.

❖ Flavonoïde (Fraction butanolique)

Pour la fraction butanolique, l'extrait de la partie aérienne a révélé une activité de piégeage du DPPH plus élevée que celle des racines ; son pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 62% à une concentration de 1,5 mg/mL contre 58% à une concentration de 6 mg/ml pour les racines.

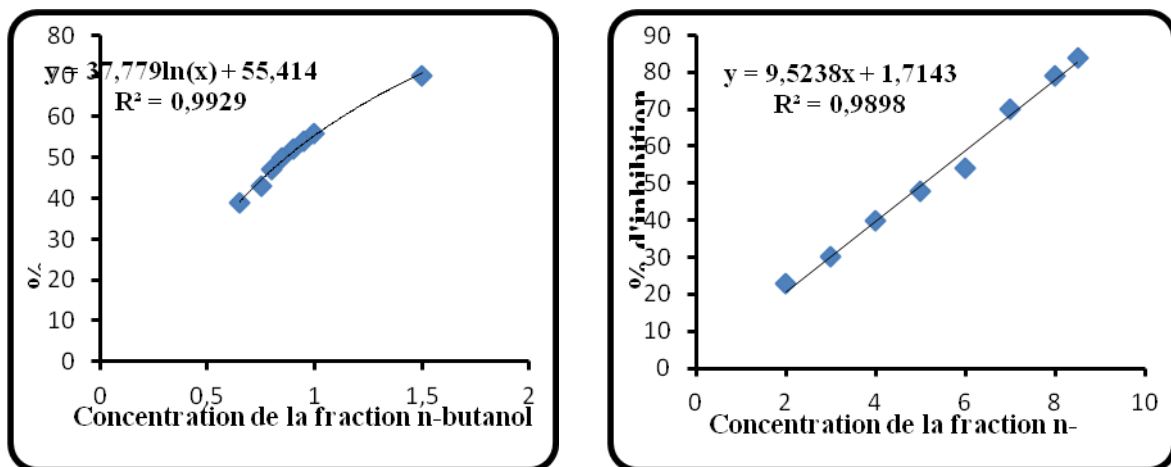


Figure 67: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les fractions butanoliques de deux parties étudiées de la ssp coloratus.

❖ Tanins

Les tanins, aussi bien de la partie aérienne que des racines, présentent un pouvoir de piégeage du DPPH intéressant du fait qu'à de très faibles concentrations, les pourcentages d'inhibition obtenus sont très élevés. En effet, une concentration de l'ordre de 0,45 mg/mL produit un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 78% pour l'extrait de tanin de la partie aérienne et, de l'ordre de 74% à une concentration de 1mg/mL pour les racines.

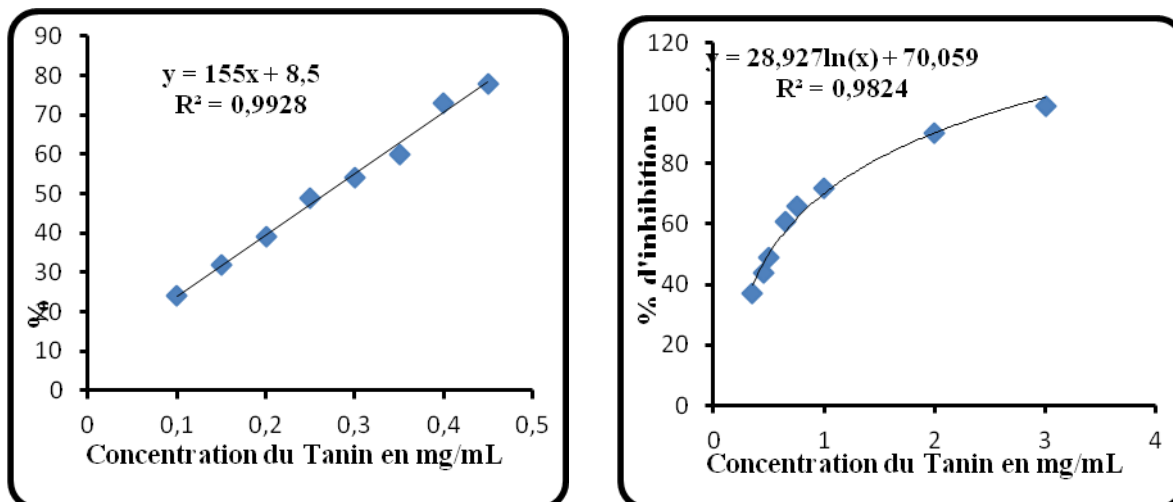


Figure 68: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les tanins de deux parties étudiées de la ssp *euciliatus*.

➤ Calcul des IC₅₀

La capacité antioxydante de nos différents extraits est déterminée à partir des IC₅₀, paramètres couramment utilisés pour mesurer l'activité antioxydante. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH dans une période de temps définie. Une valeur faible d'IC₅₀ correspond à une activité antioxydante plus élevée de l'extrait (**Prakash et al., 2007**). Les IC₅₀ sont donc calculés à partir des graphes représentées sur les figures 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66,67, 68.

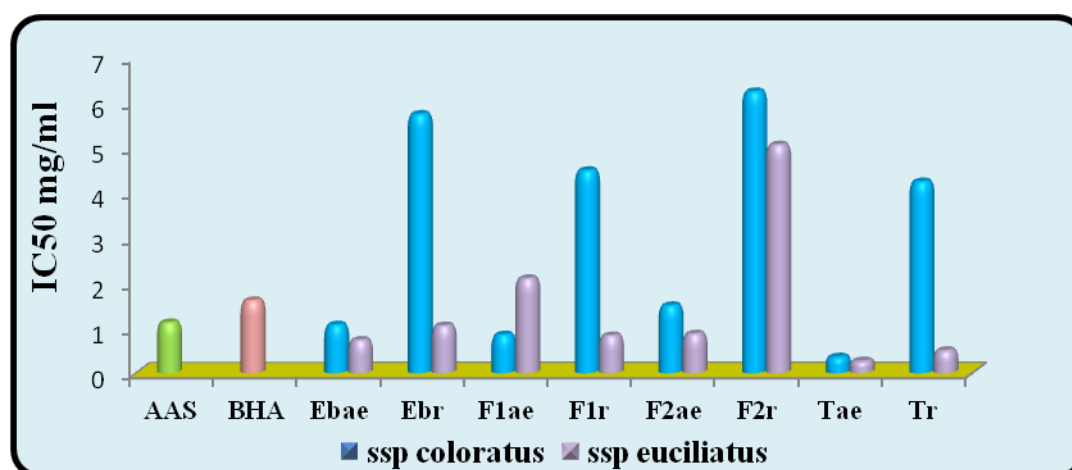
Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour tous les extraits testés de la ssp *coloratus* et la ssp *euciliatus* sont représentées dans le tableau n° 24 et dans la figure n° 69 sous forme d'histogrammes.

Tableau 24: Valeurs des IC₅₀ trouvées pour les extraits des deux parties pour les deux plantes étudiée.

plantes et	partie étudiées	IC ₅₀ exprimées en mg/mL			
		Extrait Brut	Fraction d'acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Tanin
ssp coloratus	Partie aérienne	1,07	0,85	1,5	0,36
	racine	5,75	4,5	6,25	4,25
ssp euciliatus	Partie aérienne	0,73	2,1	0,87	0,27
	racine	1,05	0,83	5,07	0,5
Acide	ascorbique	1,12			
BHA		1,62			

En comparant les IC₅₀ des différents extraits testés pour les deux parties de la ssp coloratus et de la ssp euciliatus par rapport à ceux de l'acide ascorbique et le BHA, nous remarquons une activité antioxydante élevée pour les extraits de la partie aérienne comparativement à celle des extraits des racines pour la ssp coloratus. Il en est de même pour les tanins, l'extrait brut des deux parties étudiées de la ssp euciliatus, la fraction acétate d'éthyle des racines et la fraction butanolique de la partie aérienne de la même plante.

De ces résultats, nous pouvons déduire que la réduction de 50% du DPPH a été atteinte pour tous les extraits testés.



AAS : Acide Ascorbique

BHA : Butylhydroxyanisol

F1ae : Fraction d'acétate d'éthyles des parties aérienne.

F1r : Fraction d'acétate d'éthyles des Racine.

Tae : Tanins de la partie aérienne.

Ebae : Extrait brut de la partie aérienne.

Ebr : Extrait brute des racines

F2ae : Fraction butanolique des parties aérienne

F2r : Fraction butanolique des racines.

Tr : Tanins des Racines.

Figure 69 : Histogramme des valeurs des concentration inhibitrices 50 des différents extraits en mg/mL.

D'après l'histogramme illustré dans la **figure n° 69**, nous pouvons classer les extraits par ordre de réactivité décroissante pour les deux ssp étudiées:

❖ **ssp coloratus**

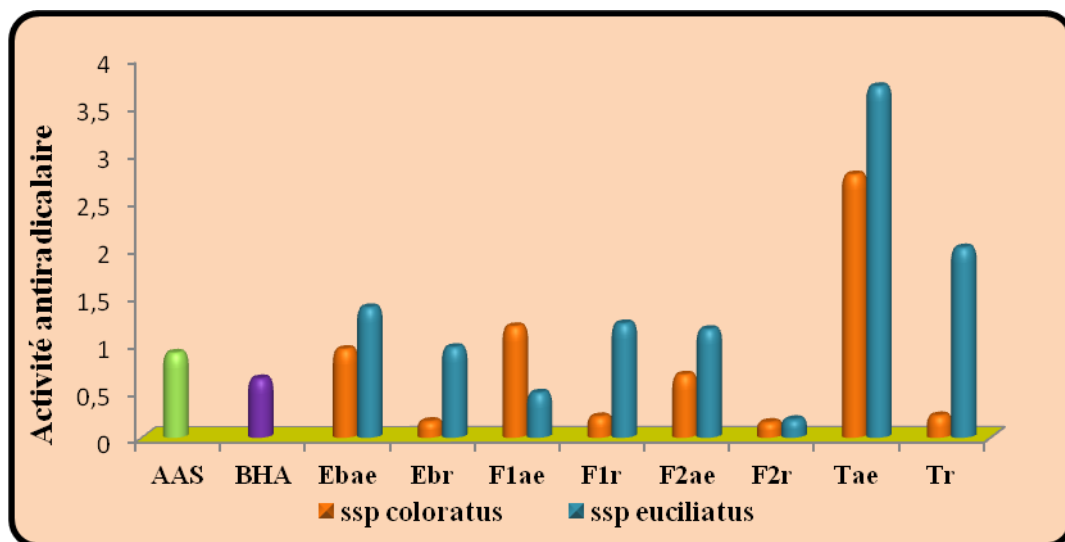
Tanins des parties aériennes>fraction d'acétate d'éthyle des parties aériennes> extrait brut des parties aériennes> acide ascorbique> fraction butanolique des partie aérienne> butylhydroxyanisol> tanins des racines> fraction d'acétate d'éthyle des racines> extrait brut des racines> fraction butanolique des racines.

❖ **ssp euciliatus**

Tanins des parties aériennes> tanin des racines> extrait brut des partie aérienne> fraction d'acétate d'éthyle des racines> fraction butanolique des parties aérienne> extrait brut des racines> acide ascorbique> butylhydroxyanisol> fraction d'acétate d'éthyle des parties aériennes> fraction butanolique des racines.

➤ **Activité antiradicalaire**

L'activité anti-radicalaire est définie comme étant l'inverse de l'IC₅₀ (1/IC₅₀) des différents extraits et est utilisée pour mieux différencier et classer les extraits d'antioxydants. Elle est représentée par les histogrammes, **figure n° 70** qui montrent une comparaison entre les activités anti-radicalaires des différents extraits et celles de l'acide ascorbique et du BHA (Maisuthisakul *et al.*, 2007).



AAS : Acide Ascorbique

BHA : Butylhydroxyanisol

F1ae : Fraction d'acétate d'éthyles des parties aérienne.

F1r : Fraction d'acétate d'éthyles des Racine.

Tae : Tanins de la partie aérienne.

EBae : Extrait brut de la partie aérienne.

EBr : Extrait brute des racines

F2ae : Fraction butanolique des parties aérienne.

F2r : Fraction butanolique des racines.

Tr : Tanins des Racines.

Figure 70: Histogramme de l'activité anti-radicalaire des extraits et de l'acide ascorbique et le BHA des deux plantes étudiées

Nous remarquons que les tanins des deux parties étudiées pour la ssp *eucliliatus* présentent l'activité anti-radicalaire la plus élevée, et nous constatons clairement que le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait brut des deux parties, fraction acétate d'éthyle des racines et fraction butanolique des parties aériennes de la même plante présentent une activité anti-radicalaire intéressante comparativement aux contrôles positifs l'acide ascorbique et le BHA. La faible activité antiradicalaire renferme la fraction acétate d'éthyle des parties aériennes et la fraction butanolique des racines de la ssp *eucliliatus*.

Nous pouvons également remarquer la prédominance des extraits des parties aériennes de la ssp *coloratus* sur les extraits des racines.

IX.3. Activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène (*H2O2 scavenging activity*)

Bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas un radical libre proprement dit, mais il représente une source importante des radicaux libres hydroxyles qui sont toxiques, surtout en présence d'ions métalliques comme le cuivre ou le fer. Aussi, le peroxyde d'hydrogène peut traverser les membranes cellulaires et peut donc oxyder et endommager de nombreux composés cellulaires.

Dans la présente étude, on soumet cette molécule qui est plutôt toxique à l'effet des antioxydants (concentration égale à 0,1 µg/mL) présents dans les extraits végétaux et on suit l'évolution de la réaction en fonction du temps (40 minutes) puis on calcule le pourcentage du piégeage du H₂O₂.

La diminution de ce pourcentage est proportionnelle à la diminution de l'absorbance. Cette dernière est due à la molécule de H₂O₂ qui absorbe dans l'UV à 230 nm (**Malgalhaes *et al.*, 2008**).

Les résultats trouvés regroupés dans les **tableaux n° 25 et 26** montrent qu'au cours de la cinétique (40 minutes) l'absorbance à 230 nm diminue en fonction du temps. Cela prouve que le peroxyde d'hydrogène cause de cette absorbance, est bien que le peroxyde d'hydrogène ne soit pas un radical libre proprement dit, mais il représente une source importante des radicaux libres hydroxyles qui sont toxiques, surtout en présence d'ions métalliques comme le cuivre ou le fer.

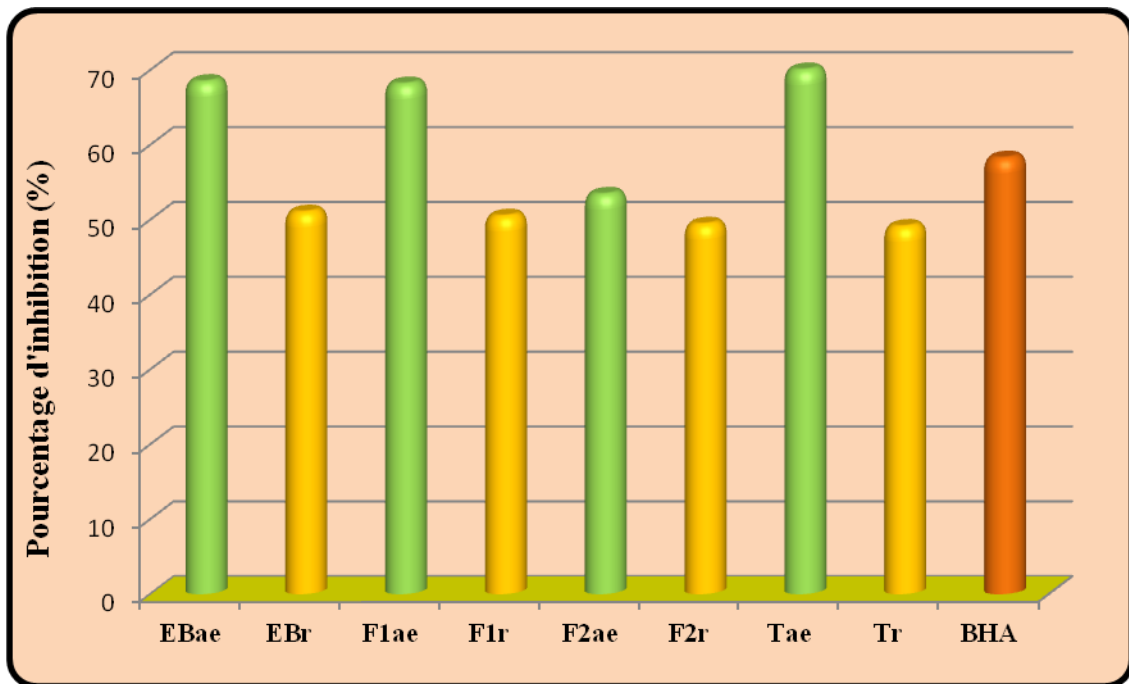
IX.3.1. Piégeage du peroxyde d'hydrogène pour la ssp coloratus

Nous avons étudié l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits des deux parties de la ssp coloratus. Les résultats obtenus sont rapportés dans le **tableau n° 25**.

Tableau 25 : Cinétique de l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits pour les deux parties étudiées de la ssp coloratus (les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions).

Echantillons	Temps (min)					
	Partie étudié	0	10	20	30	40
Extrait brut	Partie aérienne	68,43	60,64	56,78	53	46,6
	Racine	51	49,01	47,37	45,45	40
Fraction d'acétate d'éthyle	Partie aérienne	68,12	66,14	59,67	53,46	51,11
	Racine	50,46	48,36	43,52	41,25	39,53
Fraction butanolique	Partie aérienne	53,38	48,45	44	40	36
	Racine	49,38	45,01	43,48	42,10	37,60
Tanin	Partie aérienne	70	65,10	57,79	52,38	47,65
	Racine	49,07	44,59	42,5	40,37	37,50
Butylhydroxyanisole(BHA)		58,22	56,12	53,32	47,5	45,42

Dans l'étude menée par **Shon et al., (2007)**, les auteurs utilisent les valeurs obtenues à t_0 et comparent l'activité des extraits par rapport au contrôle positif ; type d'expression de résultats que nous avons adoptés dans notre cas. La **figure n° 71** montre les pourcentages de piégeage du peroxyde d'hydrogène trouvés à t_0 pour les différents extraits étudiés et celui du BHA.



BHA : Butylhydroxyanisol

EBae : Extrait brut de la partie aérienne.

F2ae : Fraction butanolique des parties aérienne

EBr : Extrait brute des racines

F2r: Fraction butanolique des racines.

F1ae : Fraction d'acétate d'éthyles des parties aérienne

Tae : Tanins de la partie aérienne.

F1r : Fraction d'acétate d'éthyles des Racine.

Tr: Tanins des Racines.

Figure 71: Histogramme des pourcentages de piégeage peroxyde d'hydrogène pour les différents extraits étudiés comparés à celui du BHA pour la ssp coloratus au temps initial (t=0).

A la concentration utilisée (0,1 $\mu\text{g/mL}$) et au temps initial (t=0), les extraits bruts, la fraction d'acétate d'éthyle et les tanins de la partie aérienne de la plante étudiée ont une bonne activité pour le piégeage de H_2O_2 avec les pourcentages d'inhibition suivants : **68,43%** ; **68,12%** et **70%** respectivement comparativement au contrôle positive BHA qui exerce un effet avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de **58,22%**.

Concernant la fraction butanolique de la partie aérienne et les extraits de la partie racines, ils présentent une faible activité vis-à-vis du piégeage de peroxyde d'hydrogène.

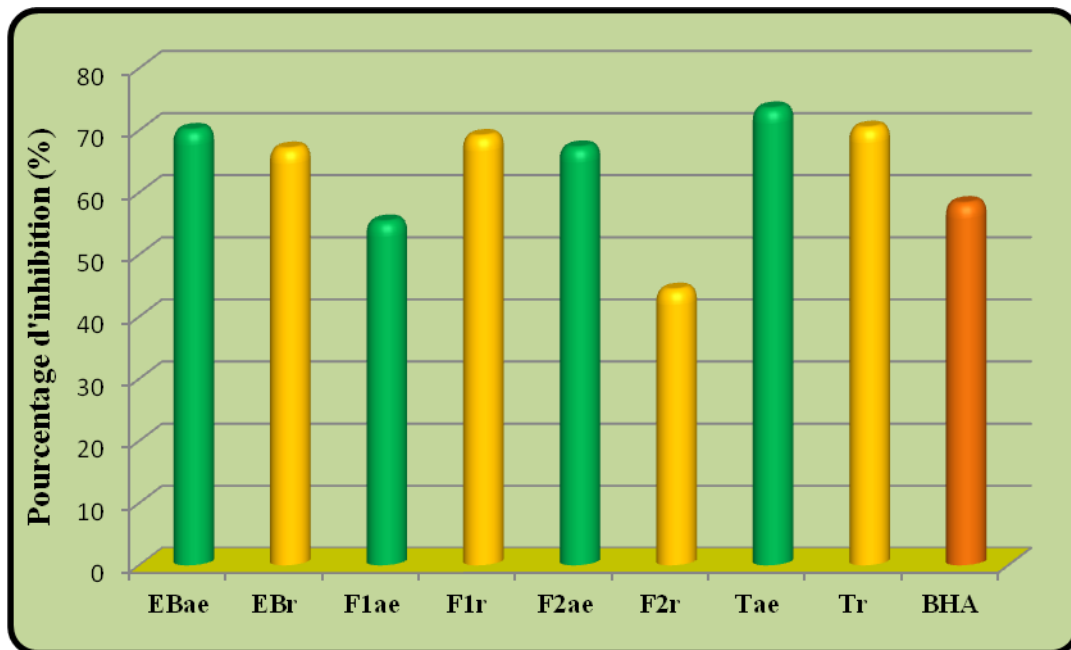
IX.3.2. Piégeage du peroxyde d'hydrogène pour la ssp euciliatus

Les résultats obtenus de cinétique de l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ des extraits des deux parties de la ssp euciliatus sont mentionnés dans le tableau n°26.

Tableau 26 : Cinétique de l'activité du piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits de la ssp euciliatus pour les deux parties étudiées (les valeurs représentent les pourcentages d'inhibitions).

Echantillons	Temps (min)					
	Partie étudié	0	10	20	30	40
Extrait brut	Partie aérienne	70	68,62	65,19	63,20	56,04
	Racine	67	63,70	61,61	57,8	53
Fraction d'acétate d'éthyle	Partie aérienne	55,26	53,08	49,67	47,10	40
	Racine	69,03	65,11	61,24	58,25	54,54
Fraction butanolique	Partie aérienne	67,19	65,18	60,37	58,2	56,71
	Racine	44,29	40,40	38	36,33	34,73
Tanin	Partie aérienne	73,47	68,32	66,45	63,60	57,3
	Racine	70,36	69,09	65,76	63,29	61,25
Butylhydroxyanisole(BHA)		58,22	56,12	53,32	47,5	45,42

La **figure n°72** montre les pourcentages de piégeage du peroxyde d'hydrogène trouvés à t₀ pour les différents extraits étudié de la ssp euciliatus et celui du BHA.



BHA : Butylhydroxyanisol

EBae : Extrait brut de la partie aérienne.

F2ae : Fraction butanolique des parties aérienne

EBr : Extrait brute des racines

F2r : Fraction butanolique des racines.

F1ae : Fraction d'acétate d'éthyles des parties aérienne

Tae : Tanins de la partie aérienne.

F1r: Fraction d'acétate d'éthyles des Racine.

Tr : Tanins des Racines.

Figure 72 : Histogramme des pourcentages de piégeage peroxyde d'hydrogène pour les différents extraits étudiés comparés à celui du BHA pour la ssp *eucliiatus* au temps initial (t=0).

D'après l'histogramme de la **figure n° 72**, l'extrait brut, les tanins pour les deux parties étudiées, la fraction butanolique de la partie aérienne et la fraction d'acétate d'éthyle des racines exercent un effet puissant pour le piégeage de peroxyde d'hydrogène au temps initial (t=0) avec les pourcentages d'inhibition suivants : **70%** pour l'extrait brut de la partie aérienne, **67%** pour l'extrait brut des racines, **73,47%** pour les tanins de la partie aérienne, **70,36%** pour les tanins des racines, **67,19%** pour la fraction butanolique de la partie aérienne et **69,03%** pour la fraction d'acétate d'éthyle des racines ; celui du BHA représente un pourcentage d'inhibition de l'ordre **58,22%**. La fraction d'acétate d'éthyle de la partie aérienne et la fraction butanolique de la partie racines montrent de faibles activités avec des pourcentages d'inhibition respectifs de **55,26** et de **44,29%**.

IX.4. Activité antioxydante par la méthode de décoloration du bêta-carotène (*β-carotene bleaching method*)

Afin d'évaluer l'activité antioxydante de nos extraits pour les deux parties de nos deux plantes, nous avons utilisé la méthode de décoloration du β -carotène en présence des extraits et/ ou des témoins (négatif et positif). La β -carotène présente une forte activité biologique et est importante comme composé physiologique puisqu'elle est le précurseur du rétinol. Ainsi le taux de dégradation ou de décoloration du β -carotène dépend de la capacité antioxydante de nos extraits.

Les hydro-péroxydes de l'acide linoléique attaquent la molécule de β -carotène et, par conséquent, subit une décoloration rapide en l'absence d'antioxydants. Cette diminution de la coloration correspond à une diminution de l'absorbance suivie spectrophotométriquement (**Kubola et Siriamornpun, 2008**).

Les résultats de l'effet antioxydant de nos différents échantillons sur la décoloration du β -carotène sont représentés dans les graphes ci-dessous (**figure n° 73, 74, 75, 76**).

IX.4.1. ssp coloratus

❖ Extrait brut

La **figure n° 73** montre la cinétique de la décoloration de β -carotène induite par l'extrait brut méthanolique de la ssp coloratus pour les deux parties étudiées. Nous remarquons clairement que l'extrait brut de la plante étudiée de la partie aérienne présente une très bonne activité protectrice vis-à-vis du β -carotène comparée à celle du contrôle positif BHA.

Il est à noter que l'extrait brut des racines de la ssp coloratus testé présente une faible activité à protéger la décoloration de β -carotène.

Nous remarquons aussi que la cinétique produite par le contrôle négatif qui constitue la limite inférieure de l'activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène est décroissante avec des absorbances qui convergent vers zéro.

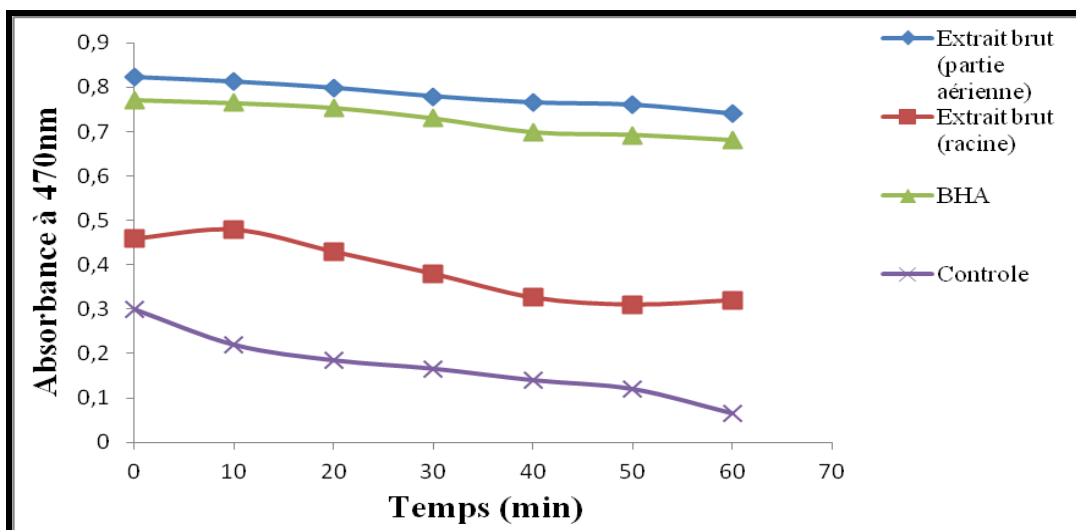


Figure 73 : Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par l'extrait brut de la ssp *coloratus*.

❖ **Flavonoïdes (Fraction d'acétate d'éthyle)**

D'après la **figure n° 74**, il est évident que le BHA et la fraction d'acétate d'éthyle testés des deux parties de la ssp *coloratus* inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène par rapport au contrôle négatif.

La fraction d'acétate d'éthyle de la partie aérienne montre la plus grande activité inhibitrice par rapport au témoin utilisé BHA.

Notons aussi que la fraction d'acétate d'éthyle des racines représente la fraction la moins active vis-à-vis de l'inhibition de la décoloration du β -carotène comparée à celle du contrôle positif BHA.

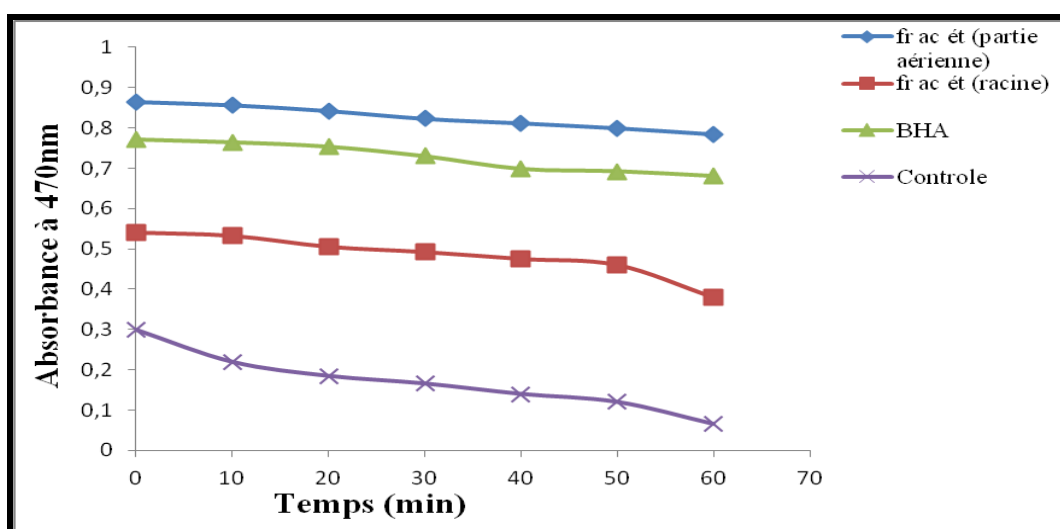


Figure 74: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction d'acétate d'éthyle de la ssp *coloratus*.

❖ Flavonoïde (Fraction butanolique)

Pour se renseigner sur la puissance de nos extraits à ralentir la vitesse de l'oxydation des lipides, nous avons réalisé un suivi de la réaction de l'oxydation de l'acide linoléique par mesure de l'abaissement de l'absorbance dans le temps, ce qui est bien montré dans la **figure n° 75**.

On remarque expérimentalement qu'il n'existe pas une différence entre la fraction butanolique de la partie aérienne et le contrôle positif BHA qui produisent des absorbances presque similaires au cours du temps ; ces dernières reflètent le grand pouvoir à protéger le β -carotène et de ce fait, ils inhibent et retardent la décoloration de ce dernier.

Pour la partie racines, nous observons une faible activité protectrice vis-à-vis du β -carotène par rapport à celle du BHA.

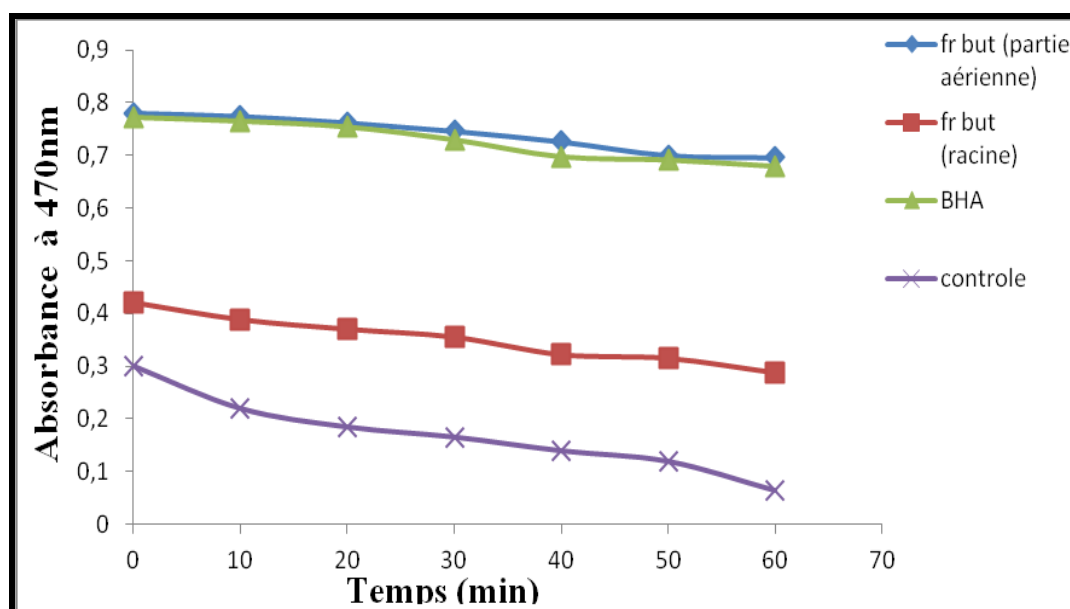


Figure 75 : Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction butanolique de la ssp coloratus.

❖ Tanins

La **figure n° 76** montre clairement que le BHA et les tanins testés de la partie aérienne et des racines de la ssp coloratus inhibent d'une manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène par rapport au contrôle négatif.

L'activité inhibitrice du BHA est moins marquée que celle de l'extrait des tanins de la partie aérienne, mais beaucoup plus active que celle de l'extrait des tanins des racines.

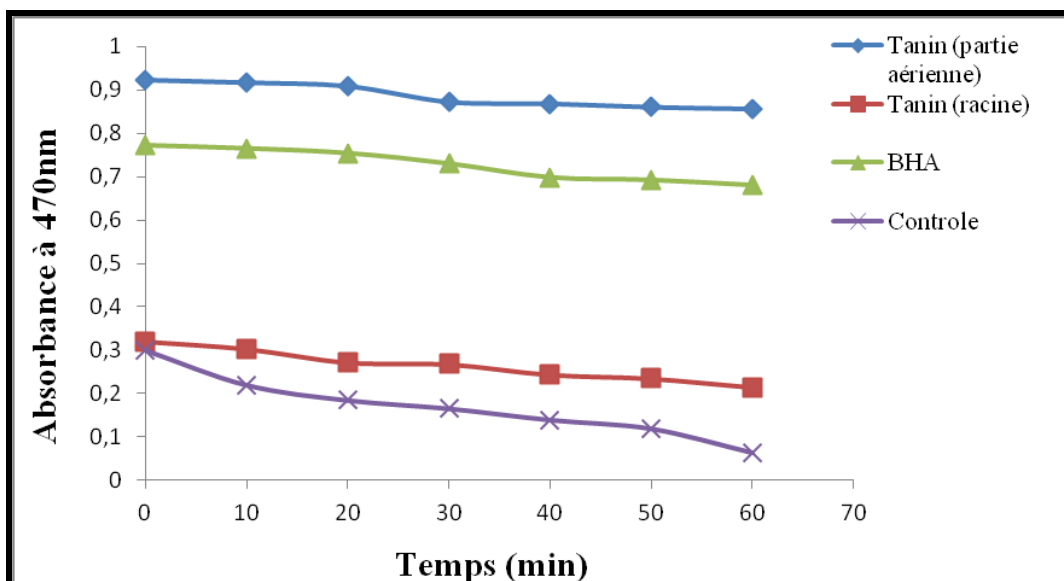


Figure 76: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par les tanins de la ssp *coloratus*.

IX.4.2. ssp *eucliatus*

Les cinétiques du blanchissement du β -carotène des extraits du ssp *eucliatus* et du BHA sont représentées dans les figures ci-dessous (**Figure n° 77, 78, 79, 80**).

❖ L'extrait brut

Concernant l'inhibition de la décoloration du β -carotène, nous remarquons clairement que l'extrait brut de la partie aérienne de la ssp *eucliatus* exerce un effet protecteur puissant vis-à-vis de la β -carotène par rapport à celui de l'antioxydant de référence (BHA) ; et que, l'extrait brut de la partie racines présente un effet similaire à celui du contrôle positif BHA.

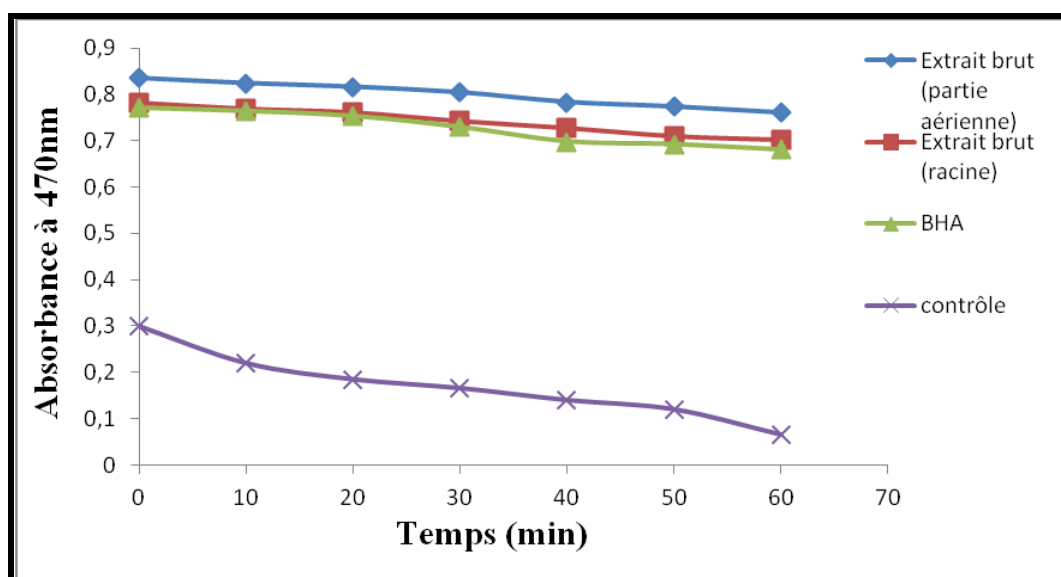


Figure 77: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par l'extrait brut de la ssp *eucliatus*.

❖ Flavonoïdes (Fraction d'acétate d'éthyle)

D'après la **figure n° 78**, nous observons un pouvoir important émanant de la fraction d'acétate d'éthyle de la partie racine à protéger le β -carotène et, de ce fait, il inhibe et retarde la décoloration de ce dernier comparée à celle de BHA.

Pour la partie aérienne, il est à noter une faible activité à inhiber la décoloration de β -carotène mais reste supérieure à celle du contrôle négatif qui constitue la limite inférieure (l'absorbance décroît et converge vers zéro).

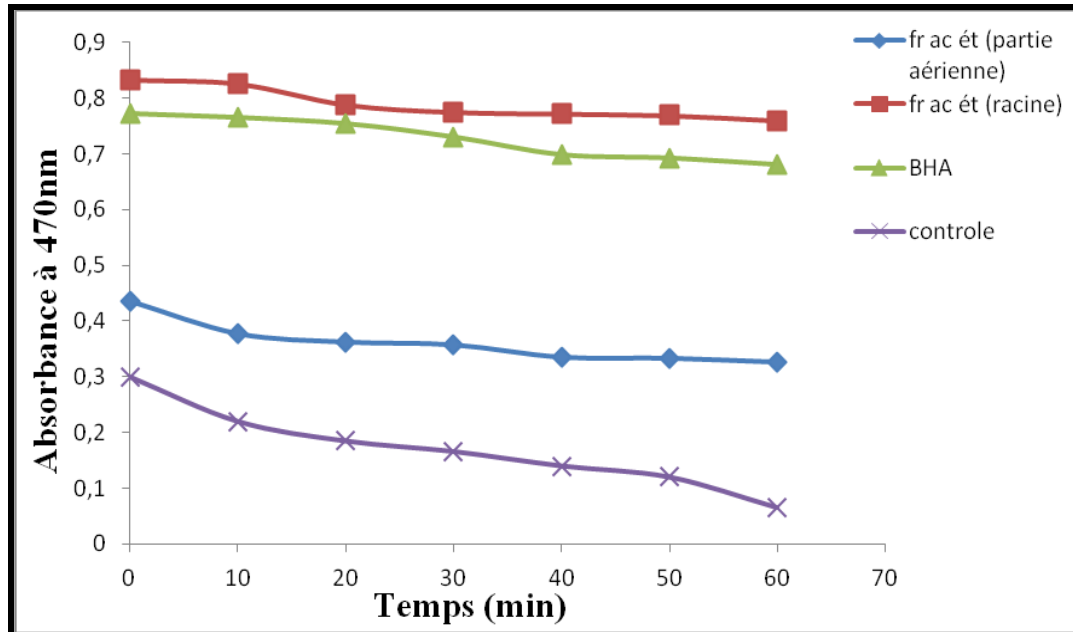


Figure 78: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction d'acétate d'éthyle de la ssp euciliatus.

❖ Flavonoïde (Fraction butanolique)

La cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction butanolique de la ssp euciliatus montre clairement que le contrôle positif du BHA et la fraction butanolique de la partie aérienne de la plante étudiée produisent des absorbances presque similaires au cours du temps (**figure n° 79**). Ces dernières reflètent le grand pouvoir à protéger le β -carotène et, de ce fait, elles inhibent et retardent la décoloration de ce dernier.

Notons aussi que la fraction butanolique de la partie racine présente une faible activité vis-à-vis de l'inhibition de la décoloration de β -carotène mais reste prononcée par rapport à celle du contrôle négatif qui constitue la limite inférieure remarquée par la cinétique décroissante qui converge vers zéro.

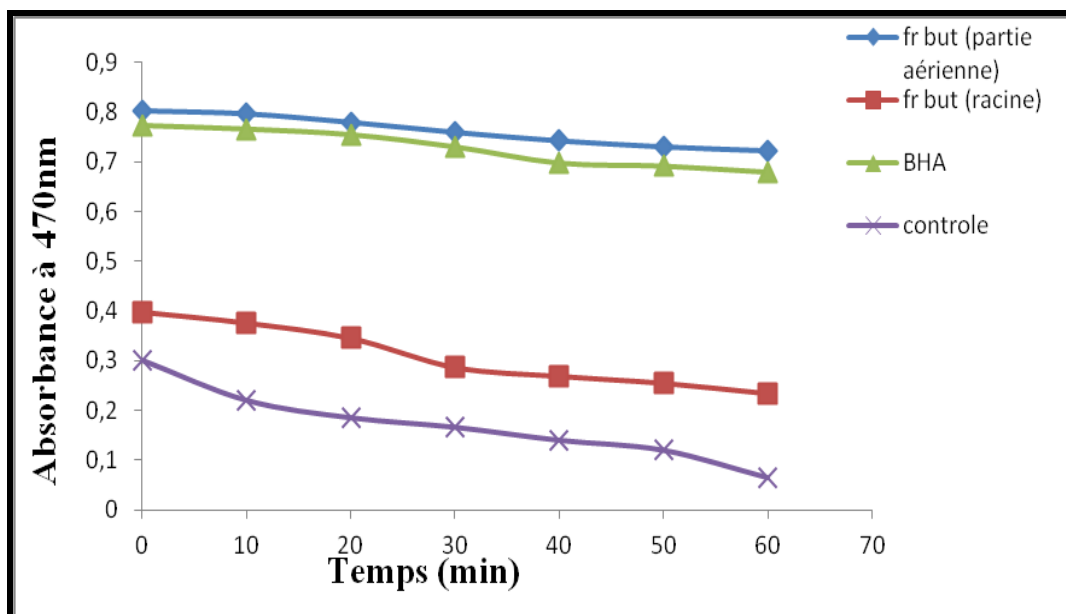


Figure 79: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par la fraction butanolique de la ssp euciliatus.

❖ Tanin

D'après les résultats obtenus à partir de la cinétique de blanchissement du β -carotène des tanins pour les deux parties de la plante étudiée, nous constatons que le contrôle positif (BHA) et l'extrait des tanins testés inhibent d'une manière significative le blanchissement du β -carotène par rapport au contrôle négatif. Cependant, la plus grande activité inhibitrice revient à l'extrait des tanins de la partie aérienne et des racines.

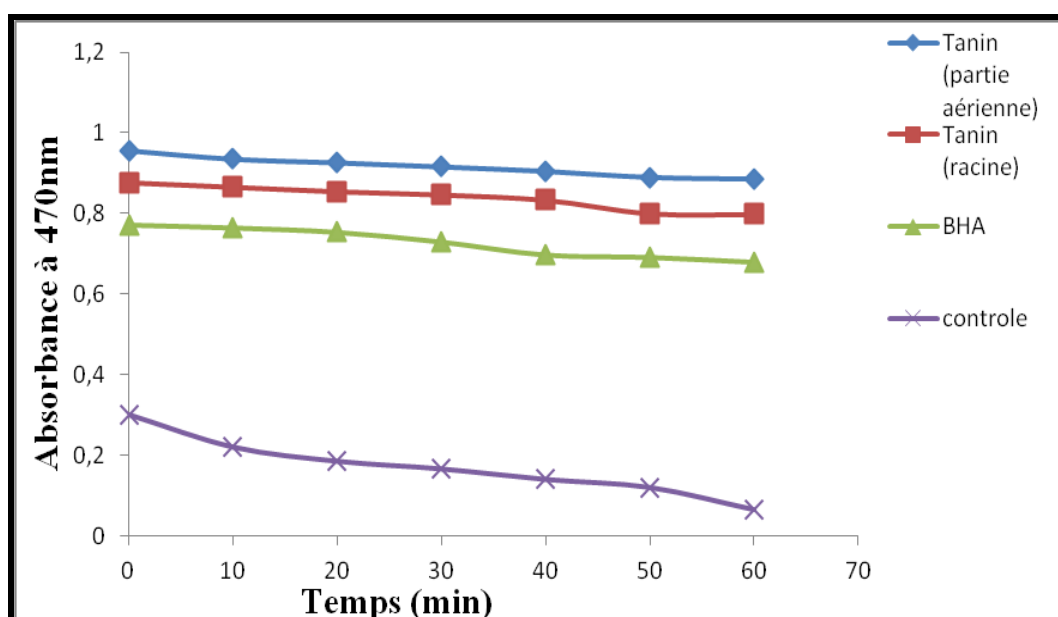
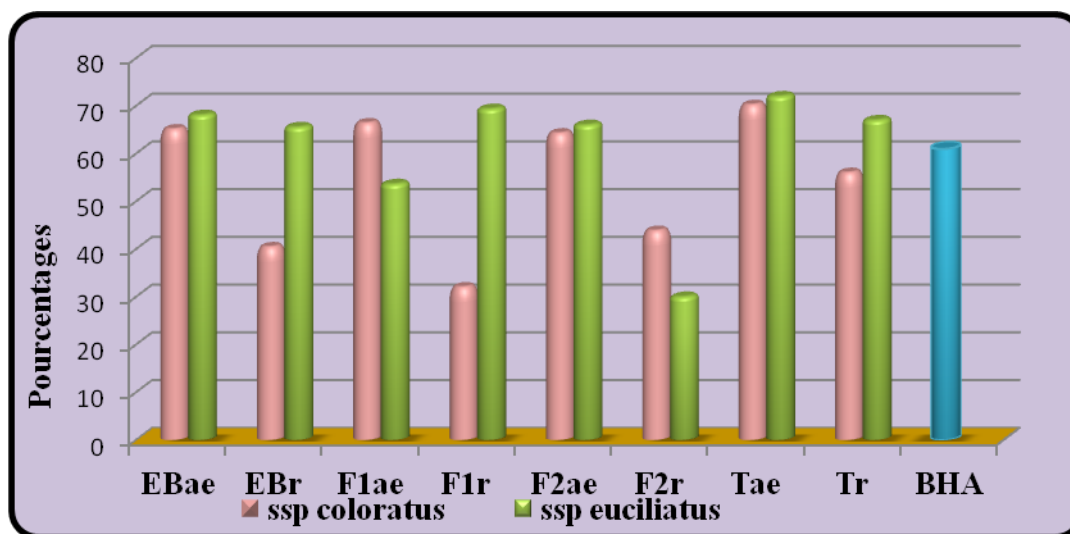


Figure 80: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par les tanins de la ssp euciliatus.

L'histogramme (**Figure n° 81**) représente le pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène pour chaque extrait comparé à celui du BHA à la même concentration de 2,5 mg/mL pour les deux ssp espèces.



BHA : Butylhydroxyanisol

EBA : Extrait brut de la partie aérienne.

F2A : Fraction butanolique des parties aérienne

EBR : Extrait brute des racines

F2R : Fraction butanolique des racines.

F1A : Fraction d'acétate d'éthyles des parties aérienne

TA : Tanins de la partie aérienne.

F1R : Fraction d'acétate d'éthyles des Racine.

TR : Tanins des Racines.

Figure 81 : Pourcentage d'inhibition de la décoloration de la β -carotène.

En comparant les résultats obtenus avec celui de l'antioxydant standard (BHA) qui présente une activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène modérée avec le pourcentage d'inhibition de l'ordre de **61%**, nous constatons que les tanins de la partie aérienne de la ssp coloratus et la ssp euciliatus présentent les activités inhibitrices les plus élevées respectives de **70,21** et **72%**, suivies de celle de l'extrait brut de la partie aérienne des deux plantes avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de **65,10%** pour la ssp coloratus et de **68,08%** pour la ssp euciliatus.

Aussi, nous constatons que les extraits bruts de la partie racines de la ssp euciliatus (**65,53%**), de la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne de la ssp coloratus (**66,38%**) et de la fraction d'acétate d'éthyle de la partie racines de la ssp euciliatus (**69,36%**) exercent un effet important vis-à-vis de l'inhibition de la décoloration du β -carotène. Il en est de même pour la fraction butanolique de la partie aérienne des deux plantes avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de **64,25%** et de **66%** respectivement. Notons aussi que les tanins des racines de la ssp euciliatus présentent une activité inhibitrice élevée avec un pourcentage d'inhibition de **67%**.

Chapitre 4 : Discussion

Les plantes représentent l'essentiel de la pharmacopée et l'avènement de la chimie moderne. Les analyses phytochimiques sur les extraits des végétaux est une étape préliminaire et d'une grande importance puisqu'elle révèle la présence des constituants connus par leur activités physiologiques et possédant des vertus médicinales (**Sofowora, 1993**). Les recherches effectuées sur les différents extraits révèlent la présence d'importants métabolites secondaires comme les flavonoïdes, les tanins, les stérols et stéroïdes, les hétérosides stéroïdiques et une faible quantité de composés réducteurs caractérisant les extraits des racines et des parties aériennes des deux ssp étudiées avec des intensités variables. Selon les travaux antérieurs, les espèces du genre *Thymus* sont riches en flavonoïdes (**Haraguchi et al., 1996 ; Ismaili et al., 2001**) ; ces données sont comparables avec nos résultats puisque les tests ont révélé la présence des flavonoïdes avec des quantités importantes dans les racines et dans la partie aérienne de nos plantes (car les compositions des ssp *coloratus* et *euciliatus* ne sont pas identifiées dans la littérature). De point de vue biologique, ce groupe est constitué de principes potentiellement actifs rencontrés dans toute ou une partie de la plante. Ce sont des précurseurs de drogues très utiles en thérapie clinique (**Sofowora, 1993**).

Les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives. En effet, avec les progrès de la science et les moyens actuels d'analyse, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des huiles essentielles d'authentiques médicaments.

Les huiles essentielles du thym sont composées de molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure. La variabilité chimique des huiles essentielles de ces deux ssp et, au cours de différents stades de développement, sont d'ordre climatiques et environnementaux ; elles peuvent cependant être aussi d'ordre génétique et saisonnier (stade végétale) (**Loziene et al., 2007**).

Des deux ssp, la ssp *euciliatus* présente une teneur plus importante que celle de la *coloratus*. Ces variations sont liées aux différents stades de développement et aux saisons d'apparition des plantes. La saison d'apparition de la ssp *coloratus* est le printemps qui se caractérise par des jours courts, un climat humide et une température moyenne. Alors que la ssp *euciliatus* pousse en été, saison renfermant toutes les conditions favorables d'une production maximum d'huile essentielle (journées longues, climat sec, température élevée, nuit chaude et intensité lumineuse élevée).

Selon **Brun (1987)** ; les facteurs environnementaux les plus influents sur la composition des huiles essentielles sont la lumière (photopériode et intensité lumineuse) et la température.

D'après **Burbott et Loomis (1987)**, il apparaît que, en jours long une intensité lumineuse et une température élevée favorise la production d'huile essentielle. L'augmentation de la quantité d'huile essentielle avec la longueur du jour s'accompagne d'une augmentation du taux de matière sèche par plante et de la teneur en huile essentielle.

El-Keltawi et Croteau (1986 «a», «b») ont montré que les régulateurs génétiques sont responsables de la formation d'huile essentielle par un effet direct sur le métabolisme des mono-terpènes et sur les niveaux d'activité des enzymes biosynthétiques.

Les travaux de **Loukidi (1990)** sur le *Thymus ciliatus* de Terny présente un rendement de **1,56%** et celui de Sidi-Djillali de **1,45%**. Ces teneurs sont moins importantes que celle de la ssp euciliatus et de celle provenant du Maroc qui présente un rendement moyen de l'ordre de **0,1% Benjilali (1987)** (cette teneur se rapproche à celle de la ssp coloratus).

La comparaison de nos résultats relatifs aux caractères physico-chimiques avec ceux des autres espèces du genre *Thymus*, nous a permis d'établir que :

Caractères physiques

- la densité de la ssp euciliatus (0,9521-0,9602) est voisine de celle de *Thymus vulgaris* (0,904-0,955) [**Pharmacopée Française (1976)**] ; alors que la ssp coloratus (0,8291-0,8810) est la moins dense de toutes les autres espèces de Thym,
- l'indice de réfraction de la ssp coloratus (1,4609) est proche de celui de *Thymus longiflorus* (1,470) (**Cruz garcia et al., 1988**) et que celui de *Thymus serpylloide* (1,4960) déterminé par (**Crespo et al., 1988**) est voisin de celui de la ssp euciliatus (1,4872),
- les miscibilités à l'éthanol des huiles essentielles de la ssp coloratus et de la ssp euciliatus présentent des valeurs identiques que celle de *Thymus vulgaris* (2V/1V, 3V/1V) [**Pharmacopée Française (1976)**].

Caractères chimiques

- en comparant les résultats de nos indices d'acide avec ceux des travaux de **Naves (1974)**, on constate que notre huile essentielle de la ssp coloratus (2,580 à 3,415) est moins acide que celle de *Thymus vulgaris* (I.A= 8,4) et encore moins que celle de *Thymus hymnalis* (I.A= 32,0),
- l'HE de la ssp coloratus (98,49 à 99,12) présente un indice d'ester plus élevé que ceux de *Thymus vulgaris* (I.E= 18,2) et de *Thymus hymnalis* (I.E=59,2),

La CCM nous a permis de contrôler la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits.

La chromatographie sur couche mince des flavonoïdes pour les deux systèmes de solvants choisis a révélé un certain nombre de composés dans la partie aérienne et dans les racines des espèces étudiées.

➤ **ssp coloratus**

Les CCM ont révélé chez la fraction acétate d'éthyle des parties aériennes la rutine, deux flavonols qui sont la quercétine et le kaempférol et deux flavones qui sont la galangine et le 3-Hydroxyflavone et, pour les racines un seul flavonol qui est la quercétine et deux flavones qui sont le 7-hydroxyflavone et le 3-hydroxyflavone.

Tandis que dans la fraction butanolique des parties aériennes, nous avons mis en évidence la présence de catéchine, deux flavones à savoir le 3,7-dihydroxyflavone et la galangine. Dans les racines, un seul flavone est présent, la galangine.

➤ **ssp euciliatus**

❖ Un seul flavonol la quercétine et trois flavones l'apigénine, la galangine et le 3-hydroxyflavone sont mis en évidence pour la fraction acétate d'éthyle des parties aériennes. Pour les racines nous avons pu identifier un composé phénolique qui est la catéchine, un flavonol qui est la quercétine, une flavone le 3-hydroxyflavone et un flavanone.

Concernant la fraction butanolique des parties aériennes un flavone est mis en évidence la galangine et l'acide gallique ; une flavonol qui est la quercétine et la catéchine, Pour les racines un seul composé mis en évidence qui est l'acide gallique.

Ainsi que le CCM des tanins ont été mis en évidence deux composés dans la partie aérienne de la ssp coloratus, à savoir, le phloroglucinol et le pyrogallol, en plus de ces deux composés, le phloroglucinol a été révélé dans les racines de la même ssp espèce.

Pour la ssp euciliatus le pyrogallol et l'hydroquinone ont été mis en évidence dans la partie aérienne, et un seul composé qui est le phloroglucinol a été révélé dans les racines.

Les deux ssp présentent le même composé dans leurs parties racines.

L'application de la CCM comme moyen d'analyse, permet la révélation de certains constituants et surtout la mise en évidence des spots majoritaires d'huile essentielle de la ssp coloratus et de la ssp euciliatus.

Le thymol est identifié comme constituant majoritaire avec un Rf de 0,40 et de couleur rose pour la ssp euciliatus ; il est par contre moins intense dans la ssp coloratus. Cependant, nous avons constaté la présence d'un autre composé important non identifié de couleur violet verdâtre et de Rf égal à 0,68.

Les travaux de **Loukidi (1990)** sur le *Thymus ciliatus* ont mis en évidence la présence de thymol comme composé majoritaire ce qui correspond à celui de notre ssp euciliatus.

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques (qualitatives et quantitatives) importantes ayant conduit à admettre l'existence de races chimiques (**Cosentino et al., 1999**) et parmi les nombreux constituants d'une huile essentielle, l'un domine généralement ; on l'appelle composé majoritaire.

Selon les instituts de recherches des produits naturels, la composition chimique des huiles essentielles est très fluctuante. Nombreux travaux de recherche signalent l'impact des effets macroscopiques et microscopiques sur la composition chimique de l'huile essentielle. En effet, sa composition chimique peut varier considérablement en fonction de plusieurs paramètres. Elle dépend d'un grand nombre de facteurs d'ordre naturel (génétique, localisation, maturité, sol, climat, etc.) et/ou technique (la nature de stockage, la procédure d'extraction de l'essence de la plante).

Au sein d'une même espèce la composition chimique de l'huile essentielle peut être différente, on parle alors de races chimiques ou de chémotypes. Il s'agit d'un polymorphisme chimique : une espèce peut être homogène au niveau de son caryotype et produire des huiles essentielles de compositions différentes (**Bounatirou, 2007**). Le thym dont la variabilité chimique est largement influencé par son environnement (sol, altitude, pression animale ou humaine) et le climat (température, pluviométrie et ensoleillement). Le thym comprend alors 7 chémotypes différents : cinéol, géraniol, linalol, terpinéol, thuyanol, thymol, et carvacrol. Chaque chémotype est responsable d'effets qui lui sont propres et qui peuvent parfois se révéler antagonistes (**Baser, 2010**).

En effet, la composition chimique des huiles essentielles est affectée par le climat, les températures maximales et minimales, les périodes (estivale ou hivernale), la durée d'ensoleillement et le pic des radiations solaires, la pluviométrie, l'altitude, la nature du sol et son pH (**Boukhatem et al., 2010**).

La séparation et l'identification des constituants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. En effet, la CPG est la méthode de référence dans l'analyse des huiles essentielles.

La CPG de l'H.E de la ssp *coloratus* montre la richesse de l'huile en composés par rapport à la ssp *euciliatus* et, que le Thymol est le composé majoritaire de la ssp *euciliatus* alors qu'il est présent dans la ssp *coloratus* avec un pourcentage de 12,30% au mois de mai et de 3,37% au mois de juin. Ceci confirme réellement les résultats d'analyse obtenus par CCM.

En comparant nos résultats avec ceux de **Benjilali et al (1987)**, la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* d'origine marocaine montre une très grande hétérogénéité. Les composés majoritaires de ces huiles essentielles sont le Linalol (0 à

11,4%), le camphre (0,4 à 28,4%), le bornéol (0,1 à 31,6%), l'acétate de linalyle (0 à 12,9%), le thymol (0,3 à 29,3%), le carvacrol (0,4 à 21,7%) et l'oxyde de caryophyllène (1 à 8,2%).

Par contre l'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* de Tlemcen provenant de Sidi-Djilali et établie par **Loukidi (1990)**, montre que le thymol est le composé majoritaire avec une teneur de 45%.

Ce résultat confirme la similarité de notre sous espèce euciliatus, en raison de sa richesse en thymol.

Le potentiel d'une plante médicinale est attribué à l'action de ses constituants phytochimiques (**Oyedjei et al., 2011**). Ils sont produits comme métabolites secondaires, en réponse au stress environnemental ou pour assurer un mécanisme de défense aux agressions provoquant des maladies chez les végétaux (**Okwu et Okwu, 2004**). Un grand nombre d'effets biologiques sont raccordés à ces composés. Beaucoup de travaux ont décrit que les composés phénoliques sont connus par de nombreuses propriétés à savoir : l'anti-apoptotique, l'antivieillesse, l'anti-carcinogène, l'anti-inflammatoire, l'antiathérosclérotique, la protection contre les maladies cardiovasculaires, l'amélioration de la fonction endothéliale ainsi que l'inhibition de l'angiogenèse et la prolifération cellulaire (**Han et al., 2007**). Mais on continue de s'interroger sur le l'impact réel de leur action anti-oxydante sur la santé humaine (**Hennebelle et al., 2004**).

La phytochimie quantitative a révélé des taux notables et variables en polyphénols, flavonoïdes et tanins. Dans les extraits bruts, les taux les plus élevés de polyphénols se rencontrent dans l'extrait de la ssp euciliatus (**636,30mg GAE/g**) dans la partie aérienne et de (**314,70 mg GAE/g**) pour les racines, suivi par la ssp coloratus qui possède une teneur en polyphénols totaux de l'ordre de **606,9mgGAE/g** et de l'ordre de **177,07mgGAE/g** pour les racines ; les flavonoïdes se concentrent principalement dans les extraits de la ssp euciliatus avec **65,4 mg EQC /g** pour la partie aérienne et **31,05 mg EQC /g** pour les racines suivi par la ssp coloratus **62,4mg EQC /g** pour la partie aérienne et **17,1 mg EQC /g** pour les racines. Concernant les tanins, c'est également la ssp euciliatus qui a donné les taux les plus élevés (**200,93 mg EQC /g pour la partie aérienne et 108,03 mg EQC /g** pour les racines), suivi de la ssp coloratus qui présente une teneur de **132 mg EQC /g** pour la partie aérienne et **67,58 mg EQC /g** pour les racines.

Donc la détermination de la teneur en phénols totaux donne une idée du potentiel antioxydant des extraits, mais elle ne peut pas être utilisée pour prédire le comportement antioxydant. En effet, il s'agit d'une méthode générale qui ne donne pas d'information concernant la nature des molécules phénoliques qui se trouvent dans les extraits. Par

conséquent, on ne pourra pas établir une relation entre la quantité des phénols et l'effet antioxydant (**Martha, 2008**). Cela nous a conduits à faire une étude du pouvoir antioxydant par des méthodes spécifiques à savoir la réduction de fer, le piégeage de DPPH, le piégeage du peroxyde d'hydrogène et la décoloration du bêta-carotène.

Les résultats du dosage prouvent que l'essentiel de ces métabolites se retrouvent dans la ssp *euciliatus* et, cette distribution dépend de la nature des substances phénoliques contenues dans chaque extrait brut, de leur solubilité et de la polarité de chaque solvant. Le groupe des composés phénoliques est l'un des groupes ubiquitaires le plus largement distribués chez les végétaux (**Singh, 2007**). Les antioxydants extraits des plantes sont en majeure partie des composés phénoliques dont les flavonoïdes, les tannins et les acides phénols (**Sharif Ali et al., 2008**). Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour leurs activités antioxydantes du fait de la présence de nombreux hydroxyles pouvant réagir avec les radicaux libres (**Klervi, 2005 ; Panovska, 2005 ; Sokol-Letowska, 2007**).

Diverses études ont déterminé expérimentalement les capacités des extraits naturels à piéger les radicaux libres. Cette activité dépend d'un certain nombre de paramètres : la dose, la structure, les substituants et le degré de polymérisation de la molécule (**Uchida et al., 1987 ; Kitagawa et al., 1992**). Le DPPH est un radical libre stable, qui accepte un électron ou un proton pour donner une molécule diamagnétique stable. Il est très utilisé dans le criblage des activités de piégeage des radicaux libres. La réaction chimique dans la technique DPPH implique un transfert d'électrons d'un donneur (antioxydant) vers le radical libre DPPH et la réduction de ce dernier en α - α ,diphényl-b-picryl-hydrazine de couleur jaune.

Benzie et Strain (1996) ont considéré l'antioxydant comme toute molécule capable de réduire les espèces oxydantes qui peuvent endommager les structures biologiques. Ces auteurs ont donc interprété l'activité antioxydante comme la capacité réductrice. Cependant, le pouvoir antioxydant d'un antioxydant n'est pas nécessairement égal à sa capacité de réduire le DPPH.

Le degré de décoloration exprime le potentiel de piégeage de l'antioxydant, on considère les flavonoïdes, et les tannins comme des substances potentiellement antioxydantes (**Madhuri et Pandey, 2009**). Cependant, la présence de ces substances indique que nos extraits et fractions sont dotés d'une activité antioxydante. Les meilleurs antioxydants naturels sont les fractions acétate d'éthyle de flavonoïde et les tanins non seulement pour ce test mais aussi pour les autres méthodes appliquées dans ce travail.

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été utilisée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante.

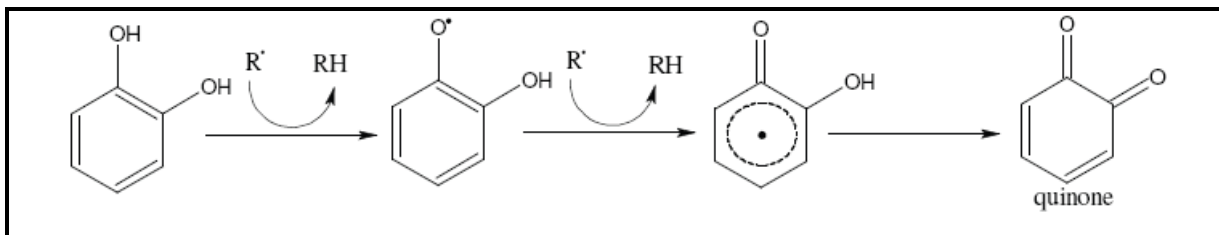
Le mécanisme de la réaction entre l'antioxydant et le DPPH dépend de la conformation structurale de l'antioxydant. L'activité des flavonoïdes pour le piégeage de ce radical dépend de la présence des groupements hydroxyles, et plus particulièrement du 3-OH.

Aussi les flavonoïdes les plus puissants sont ceux qui comportent le groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3. La présence de la double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo est aussi connue comme responsable de la délocalisation des électrons du cycle B et augmentera ainsi la capacité du piégeage d'un radical.

Une meilleure activité requiert essentiellement la structure 3',4'-ortho-dihydroxy sur le cycle B et le groupement 4-carbonyl sur le cycle C qui confère la stabilité au radical flavonoxy (A.) dans la réaction suivante :



Ce dernier va réagir avec d'autres radicaux (réaction de couplage radical-radical) pour donner une structure stable (Harborne et Williams, 2000 ; Sharififar *et al.*, 2009).



(Où R• représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle)

Figure82 : Piégeage des ROS (R) par les flavonoïdes (marfak, 2003).

En comparant l'activité antioxydante des deux fractions étudiées, nous avons remarqué que la fraction acétate d'éthyle présente plus d'activité par rapport à la fraction butanolique. Nos résultats confirment ceux publiés par Tian *et al.*, 2009 et Fabri *et al.*, 2009.

Les pièges les plus efficaces du radical libre DPPH sont ceux possédant les valeurs IC₅₀ les plus basses : la fraction acétate d'éthyle (0,85mg/mL) et les tanins (0,36mg/mL) des parties aériennes de la ssp coloratus ainsi que la fraction acétate d'éthyle (0,83mg/mL) des racines, la fraction butanolique (0,87mg/mL) et les tanins (0,27mg/mL) des parties aériennes de la ssp euciliatus.

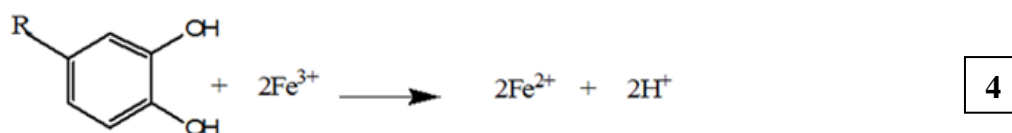
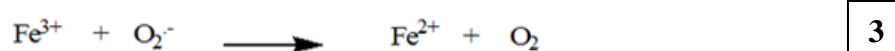
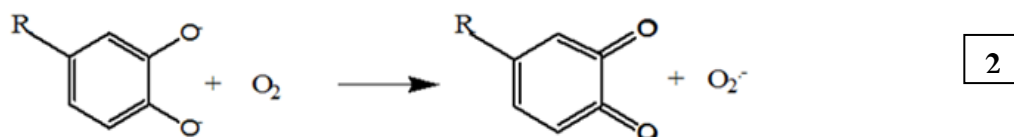
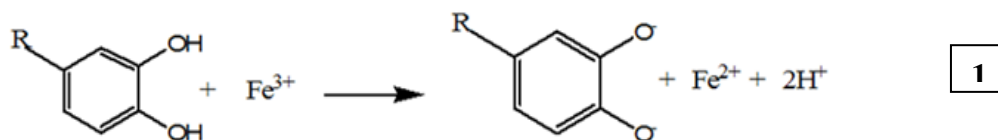
Les activités anti-radicalaires et antioxydantes de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* ont été testées par Bouhdid et ses collaborateurs (2006) par le test du DPPH. Le pouvoir antioxydant manifesté a été interprété par une action combinée des différents antioxydants endogènes contenus dans l'huile. Le thymol, composé majeur de l'huile essentielle aussi bien que le carvacrol, sont de puissants agents réducteurs du radical DPPH et (Brunton, 1999).

L'étude menée par **Kulšić et ses collaborateurs (2006)** a montré aussi que l'extrait aqueux des feuilles de *Thymus vulgaris* on présenté une activité antioxydante importante. Dans cet extrait, les polyphénols (surtout les flavonoïdes), l'acide rosmarinique, l'acide caféique et la vitamine E peuvent expliquer l'activité exhibée (**Guillén et Manzanos, 1998 ; Thuille et al., 2003 ; Kuliši et al., 2006**).

La réduction du fer est une analyse de l'activité antioxydante rapide, reproductible et facile à exécuter. Le pouvoir réducteur sert comme indicateur très significatif du potentiel antioxydant proposé pour tester l'activité antioxydante. La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Yang et al., 2008**).

Une étude récente faite sur cette capacité de réduction de fer par les polyphénols des plants a indiqué que le noyau catéchol est la seule structure qui est associée positivement dans le pouvoir réducteur et, selon cette étude, cette structure augmentera le pouvoir réducteur d'un composé à 36% par rapport à un autre qui n'en contient pas. Ils ont suggéré que cette activité est due à la participation des groupements –OH liés au noyau catéchol.

La réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} par les groupes –OH du catéchol peut être décrite par les quatre réactions suivantes :



L'oxydation initiale du catéchol par Fe^{3+} conduit à la génération de Fe^{2+} et une structure en semi-quinone (**réaction 1**). La semi-quinone peut réagir avec l' O_2 dissous dans le mélange réactionnel avec une libération ultérieure d'ions superoxydes (**réaction 2**).

L'ion superoxyde peut également réduire l'ion Fe^{3+} (**réaction 3**). Ainsi, l'oxydation de 2 groupements $-OH$ peut résulter de la réduction de 2 ions Fe^{3+} (**réaction 4**).

L'activité des groupements $-OH$ du catéchol peut être modulée par une variété de substituants sur le noyau aromatique. Par exemple, la substitution sur le noyau phénolique d'un groupement donneur d'électrons ($-CH_3$, $-CH_2-CH_3$, ou d'autres substituants aliphatiques) promouvra des réactions dans lesquelles les noyaux phénoliques acquièrent une tendance de donner des électrons via un groupement $-OH$, et finalement augmentent leur capacité de réagir comme des réducteurs.

D'autre part, la double liaison dans le substituant aliphatique conjugué avec le noyau aromatique diminue la réactivité du groupement $-OH$ (**DeGraft-Johnson et al., 2007**). Beaucoup de publications ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (**Yildirim et al., 2001**).

Les résultats obtenus, pour un extrait végétal qui possède une grande activité, suggèrent que ce dernier a un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux radicaux libres réactifs (ou espèces réactives), les convertissant en espèces non-réactives plus stables et, terminant ainsi la réaction en chaîne des radicaux libres.

Nous avons remarqué que les parties aériennes pour la ssp *euciliatus* et la ssp *coloratus* ont présenté des activités antioxydantes importantes par rapport à l'acide ascorbique et le BHA. En revanche, ceci peut être expliqué probablement par la présence des composés flavonoïdiques tels que les flavonols et les isoflavones dans ces plantes et la présence d'autres composés capables de réduire le fer.

Le peroxyde d'hydrogène, molécule qui n'est pas vraiment très réactive, peut devenir très toxique pour nos cellules en augmentant le taux de l'espèce oxygénée par sa haute réactivité, le radical hydroxyl. Cette petite molécule est capable d'inactiver directement des enzymes par oxydation des groupements thiols ($-SH$) (**Gupta, 2011**).

En effet, il est déjà prouvé que les polyphénols alimentaires protègent les cellules animales et bactériennes de la toxicité induite par H_2O_2 , avec notamment des composés phénoliques de type flavonoïdes tels que la quercétine, la catéchine et d'autres polyphénols comme les esters d'acide gallique et d'acide caféique. Nos résultats indiquent que les

composés antioxydants dans nos extraits sont de bons donneurs d'électrons, ce qui permet l'accélération de la conversion du H_2O_2 en H_2O et donc l'élimination du H_2O_2 (**Shon et al., 2007 ; Atmani et al., 2009**).

Le plus haut potentiel antioxydant est attribué à la ssp *euciliatus*, en particulier à la fraction acétate d'éthyle des racines, la fraction butanolique des parties aériennes et les tanins pour les deux parties étudiées. Il peut être expliqué par le fait que les substances contenues dans cette fraction et extrait réagissent directement et très rapidement avec le peroxyde d'hydrogène. L'activité antioxydante dépend des interactions entre les différents antioxydants. La ssp *euciliatus* est très riche en composés phénolique, avec une forte teneur en flavonoïde connues par leur grande activité antioxydante. Les effets synergiques entre les puissants constituants antioxydants phénoliques vis-à-vis du H_2O_2 de la fraction acétate d'éthyle a fait hausser l'activité antioxydante.

Le mécanisme de blanchiment du β -carotène est un phénomène dont le médiateur est un radical libre. Le β -carotène subit une décoloration rapide en l'absence d'un antioxydant qui aboutit à une réduction de l'absorbance de la solution d'essai avec le temps de réaction (**Khadri et al., 2008**) ; ceci est dû à l'acide linoléique qui produit des hydro-péroxydes pendant son incubation à $50^\circ C$ (**Kubola et Siviamornpun, 2008**). Ces derniers attaquent les insaturations du β -carotène et, en conséquence la couleur caractéristique de ce dernier disparaît (**Khadri et al., 2008**).

De ce fait, la présence d'un antioxydant dans l'extrait permettra de réduire au minimum l'oxydation du β -carotène par les hydro-péroxydes. **Deba et al., (2008)** suggèrent que l'activité antioxydante des polyphénols extraits des plantes réside dans le fait que ces derniers ont la capacité de donner des atomes d'hydrogène aux radicaux libres (hydroperoxydes du milieu réactionnel) issus de l'oxydation de l'acide linoléique et, par conséquent, stoppent l'attaque de ces radicaux sur le β -carotène. Dans le même contexte, **Mayachiew et Devahastin**, dans leur publication (**2008**), attribuent aux polyphénols leur pouvoir antioxydant, dans ce type de méthode, à leurs propriétés redox qui incluent le piégeage des radicaux libres, l'inhibition de l'oxygène singulet et leur pouvoir de céder leurs atomes d'hydrogène. Dans cette méthode, nous avons remarqué encore une fois, que la ssp *euciliatus* a présenté l'activité la plus élevée à l'exception de la fraction butanolique des racines et la fraction acétate d'éthyle de la partie aérienne par rapport à la ssp *coloratus* ; ce qui indique que cette plante possède des composés phénoliques à activité antioxydante considérable comparée à celle de l'antioxydant de référence l'acide ascorbique et le BHA. Dans le même contexte, la publication faite par **Elzaawely** et ses collaborateurs (**2007**)

signale que la fraction acétate d'éthyle révèle une activité considérable vis-à-vis de la décoloration du β -carotène.

Les résultats obtenus par ces quatre techniques pour tester l'activité antioxydante à savoir : l'étude de la capacité du piégeage du radical DPPH, la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène, l'étude du pouvoir réducteur par la méthode de la réduction du fer (FRAP) et l'étude de la capacité à inhiber la peroxydation lipidique par la méthode de la décoloration du β -carotène, sont dues aux composés phénoliques, et plus particulièrement aux flavonoïdes, puisqu'on a utilisé un mélange de solvants spécifiques à leurs extractions, et aussi parce que beaucoup d'auteurs confirment leurs contributions à cette activité **Ding et al., 2008 ; Iacopini et al., 2008 ; Vasco et al., 2008 ; Alén_Ruiz et al., 2009 ; Borneo et al., 2009.**

Sachant que les flavonoïdes sont connus par leurs activités anti-radicalaires et antioxydantes et que les extraits des plantes contenant un mélange de ces composés ont donné des résultats plus ou moins satisfaisants, on peut conclure que les résultats ont prouvé que l'activité antioxydante de ces extraits dépend non seulement du contenu phénolique total mais que les composés phénoliques peuvent agir en synergie, antagonisme ou peuvent indépendamment affecter toute l'activité du mélange (**Iacopini et al., 2008**).

L'utilisation de divers systèmes expérimentaux a prouvé que les capacités antioxydantes des flavonoïdes sont dues à leurs propriétés redox qui se traduisent dans les capacités de donner des électrons et des hydrogènes, en plus de leurs potentiels à chélater les ions métalliques pro-oxydants et leurs capacités de protection des systèmes de défenses antioxydants (**Harborne et Williams, 2000 ; Atmani et al., 2009**).

Conclusion générale

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et est devenue aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et, d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce et sans effets secondaires.

Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue un pouvoir antioxydant.

Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vu les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse à savoir le BHA, le BHT et l'acide ascorbique.

L'objectif primordial assigné par cette étude englobe le même contexte afin d'évaluer les propriétés antioxydantes de *Thymus ciliatus* ssp *euciliatus* et ssp *coloratus* qui restent toujours des plantes d'intérêt très important dans la médecine traditionnelle et dans le domaine alimentaire pour les populations locales.

L'étude de ces deux ssp nous a permis de montrer que ces deux plantes aromatiques sont productrices d'huiles essentielles avec des rendements variant au cours des différents stades de développement de chaque sous espèce et présentent des compositions riches et variées en métabolites secondaires notamment en flavonoïdes, tanins, stérols, stéroïdes et hétérosides stéroïdiques ; avec cependant une faible quantité en composés réducteurs. La ssp *coloratus* présente un rendement en huile essentielle maximum au cours de la maturité de la plante (mois de mai) et le mois de juillet pour la ssp *euciliatus*. Il est à noter que la ssp *euciliatus* présente des teneurs plus importantes en huile essentielle par rapport à la ssp *coloratus*.

La quantification par des méthodes spectrophotométriques nous a permis de déterminer les teneurs en phénols totaux par le réactif du Folin-Ciocalteu, en flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et en tannins par le test de la vanilline. Les résultats obtenus ont montré que la ssp *euciliatus* possède des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïde élevées par rapport à celles de la ssp *coloratus*.

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles des deux sous espèces par C.C.M et par C.P.G comme moyens d'analyse, a permis de mettre en évidence la présence de Thymol comme composé majoritaire dans la ssp *euciliatus* et de certains composés non identifiés dans la ssp *coloratus* avec des proportions importantes.

De ces deux techniques complémentaires d'analyse chromatographique, les résultats ont montré que la ssp *coloratus* est très riche en constituants d'huile essentielle par rapport à la ssp *euciliatus*.

Ainsi l'analyse qualitative des flavonoïdes des deux plantes par chromatographie sur couche mince nous a révélé pour la fraction acétate d'éthyle la présence de rutine, de deux flavonols (quercétine et kaempférol) et de deux flavones également (galangine et le 3-hydroxyflavone) et, pour les racines, un seul flavonol (quercétine) et deux flavones (le 7-hydroxyflavone et le 3-hydroxyflavone).

Concernant la fraction n-buOH des parties aériennes, nous avons mis en évidence la présence de la catéchine, de deux flavones (3,7-dihydroxyflavone et la galangine) ; et un seul flavone (galangine) dans les racines.

Pour la fraction AcOEt des parties aériennes de la ssp *euciliatus*, un seul flavonol (quercétine) et trois flavones (apigénine, galangine, 3-hydroxyflavone) sont mis en évidence. Quant aux racines, il y a présence d'un composé phénolique qui est la catéchine, d'un flavonol (quercétine), une flavone (3-hydroxyflavone) et un flavanone.

S'agissant de la fraction n-buOH des parties aériennes, un flavone est mis en évidence (galangine) ainsi que l'acide gallique. Une flavonol (quercétine), la catéchine et, l'acide gallique pour les racines.

Les potentialités antioxydantes de différents extraits méthanoliques et de leurs fractions acétate d'éthyle et butanolique sont évaluées par divers mécanismes ; le piégeage direct des radicaux libres par la méthode du radical libre DPPH, le piégeage du dérivé oxygéné le peroxyde d'hydrogène, le pouvoir réducteur et le pouvoir protecteur du β -carotène contre l'oxydation par les produits de peroxydation lipidique. Les résultats *in vitro* ont révélé des activités antioxydantes pour l'ensemble des extraits bruts et fractions et particulièrement les fractions organiques. Un fort pouvoir de piégeage du DPPH supérieur à celui de l'acide ascorbique et du BHA est exercé par les fractions d'acétate d'éthyle, les tanins et l'extrait brut surtout dans les parties aériennes.

Il est à noter aussi que ces deux ssp étudiées montrent un pouvoir antioxydant élevé vis-à-vis de celui du peroxyde d'hydrogène, du pouvoir réducteur et du pouvoir protecteur du β -carotène contre l'oxydation par les produits de peroxydation lipidique.

On conclue que la partie aérienne de la ssp *euciliatus* présente une activité antioxydante plus marquée que celle de la ssp *coloratus* et de celles des antioxydants de synthèse l'acide ascorbique et le BHA. Nous remarquons aussi qu'il y a une certaine conformité entre les résultats obtenus par les quatre techniques utilisées.

Les capacités antioxydantes déterminées *in vitro* sont en relation directe avec le contenu en métabolites secondaires de chaque extrait et fraction et dépendent de l'ensemble des substances antioxydantes, de leurs natures, de leurs teneurs, de leurs structures et de toutes les interactions moléculaires qui peuvent agir de façon synergique pour faire hausser cette activité.

Enfin, les antioxydants naturels des espèces végétales locales et particulièrement ceux provenant des deux ssp *coloratus* et *euciliatus* peuvent être très utiles pour renforcer l'organisme dans le cas de situation de stress oxydatif et de prévenir les différentes pathologies survenues suite à une attaque radicalaire.

Pour plus d'efficacité, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

- élargir le panel des activités antioxydantes *in vitro* et *in vivo* et pourquoi pas d'autres tests biologiques: anti-tumoral, anticancéreux et anti-inflammatoire,
- caractériser et isoler les principes actifs responsables de ces propriétés pharmacologiques.

Références bibliographiques

A

- Abderrazak M. et Joël R. La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. 2007. pp 177.
- Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F - Antibacterial Effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*-Turk J Biol; 2006.Vol.30; pp 239-242.
- AFNOR,1994. Association française de normalisation : détermination des caractères physiques et chimiques d'huiles essentielles.
- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., Lomri, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases, *Revue du Rhumatisme*, 2007, 74, 636–643.
- AFSSAPS (*Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé*) ; 2008 ; *Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles*.
- Aissaoui A., El-Hilaly J., Israili Z.H., Lyoussi B. Acute diuretic effect of continuous intravenous infusion of an aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. in anesthetized rats. *Food Chemistry*; 2008. Vol 115; pp 89-95.
- Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, M.C., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines, *Food Chemistry* 2009, 113: pp 53–60.
- Anton R., Lobstein A- Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles ; Tec&Doc. Paris, 2005, pp 522.
- Antwerpen P-V. Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myeloperoxydase /peroxyde d'hydrogène /chlorure. Thèse de Doctorat .Université libre de Bruxelles. 2006 pp 122
- Arif T, Bhosale J D, Kumar N, Mandal T K, Bendre R S, Lavekar S, Dabur R. Natural products-antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res.* 2009 ; 11, 7 : 626 – 638.
- Aruoma, O.I. Scavenging of hypochlorous acid by carvedilol and ebselen *in vitro*, *Gen Pharmacol*, 1997, 28 (2), 269-272.
- Atawodi S. E. Antioxidant potential of African plants.*African J. of Biotec.* 2005, Vol.4 (2); pp 128-133.
- Atefeibu E.S.I. Contribution a l'étude des tanins et de l'activité antibacterienne d'*Acacia Nilotica* Var *Andesonii* .Thèse de Doctorat, université cheikh Anta Diop de Dakar. 2002 pp

●Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Boudaoud, H., Debbach, N., Atmani, D., Antioxydant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants, *Food Chemistry*, 2009, Vol. 112; pp 303- 309.

B

●Babar Ali, M., Hahn, E.J., Paek, K.Y. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules*. 2007, Vol. 12 ; pp 607-621.

●Babior B-M ., Lambeth J-D ., Nauseef W. The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397 pp 342-344.

●Babulka P. Plantes médicinales du traitement des pathologies rhumatismales; de la médecine traditionnelle à la phytothérapie modern; *Phytothérapie*, 2007, Vol.5, pp 137-145.

●Bagamboula C.F., Uyttendaele M., Debevere J-Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*-*Food Microbiology*; 2004, Vol.21; pp33-42.

●Bagard S., *Physique-Chimie 1e S: Tout-en-un*, Ed. Bréal, 2008, pp. 128.

●Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Review MI-Biological effects of essential oils-A review *Food and Chemical Toxicology* ; 2008, Vol; 46; pp 446-475.

●Barboni T., Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie, Thèse de doctorat, Université de Corse, 2006, pp.21.

●Baser K.H.C., Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*, CRC Press NW., 2010, pp. 48.

●Beecher G. R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutri.*, 2003, 133 (10), 3248S-3254S.

●Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R. Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seedtannin content, and study of their seed and root phenolic exudation, *Journal Plant and Soil*, 1998, 203: pp 27-36.

●Benabid A. *Flore et ecosystems du Maroc. Evaluation et préservation de la biodiversité*. Paris : Edition Ibis Press, 2000, 159-161.

●Benderitter, M; Vincent-Genod, L; Pouget, J.P; Voisin, P. The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation, *Radiat Res* 2003, 159:471-483.

- Bendjilali B., Hammoumi M., et Richard H. Polymorphisme chimique des huiles essentielles du Maroc. Caractérisation des composants. *Science des aliments*, 1987, Vol.7 ; pp 77-91.
- Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Panovska, T.K., Antiradical capacity of the phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf., *Advances in Food Sciences*, 2007, 29 (3): pp 155-161,.
- Benkiki N. Etude phytochimique des plantes médicinales algérienne : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*-Thèse de doctorat ; Université El-Hadj-Lakhdar. Batna, 2006.
- Benzie I. F. F., Strain J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. biochem.* 1996, Vol. 239; pp 70-76.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay, *Methods Enzymol*, 1999, Vol. 299; pp 15-36.
- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., Golob, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey, *Food Chemistry*, 2007, Vol. 105; pp 822-828.
- Bessas, A; Benmoussa, L; Kerarma, M. Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie. 2007
- Beta, T; Nam, S; Dexter, J.E; Sapirstein, H.D. Phenolic content and antioxidant activity of pearled ulreat and roller – milled fractions, *Creal Chem*: 2005, pp 390 -393.
- Bhat S.V., Nagasampigi B.A. et Sivakumar M. *Chemistry of Natural Products*; Ed 1: NAROSA, SPRINGER; 2005, pp: 115-252.
- Biglari F., Alkarkhi A.F.M., Easa A.M. Antioxydant activity and phenolic content of various data palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*; 2008, Vol. 107; pp 1636-1641.
- Billerbeck V-G- Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques- Phytothérapie ; 2007, Vol. 5 ; pp 249-253.
- Bloomer RJ and Fisher-Wellman KH. Blood Oxidative Stress Biomarkers: Influence of Sex, Training Status, and Dietary Intake. *Gender Medicine*. 2008, 5(3) pp 218-28.
- Boizot, N ; Charpentier, J.P. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Méthodes et outils pour d'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques, *INRA*, 2006, pp 79-82.

- Booth N.L., Dejan N., Richard B., Stoci E. New lanthanide complexes of 4 methyl 7 hydroxy coumarin and their pharmacological activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2004, Vol. 50; pp 120-123.
- Borneo, R., León, A.E., Aguirre, A., Ribotta, P., Cantero, J.J. Antioxidant capacity of medical plants from provence of Córdoba (Argentina) and there in vitro testing in a model food system, *Food Chemistry*, 2009, Vol. 112 pp 664-670
- Botelho M.A., Nogueira N.A.P., Bastos G.M., Fonseca S.G.C., Lemos T.L.G., Matos F.J.A., Montenegro D., Heukelbach J., Rao V.S., Brito G.A.C-Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens *Lippia sidoides* essential oil against oral pathogens-Brazilian Journal of Medical and Biological Research; 2007, Vol.40; pp 349-356.
- Bouaoun D., Hilan C., Garabeth F., Sfeir R-Etude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage Prangos asperula Boiss-Phytothérapie ; 2007, Vol. 5 ; pp 129-134.
- Bouchra C., Achouri M., Hassani L.M.I, Hmamouchi M- Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr-Journal of Ethnopharmacology; 2003, Vol. 89; pp 165-169.
- Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, D.; Skali, N. S. ; Abrini, J.Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès Intrntional de biochimies, Agadir.* 2006, pp 324-327.
- Bouhdid S, Idaomar M, Zhiri A, Baudoux D, Skali N.S and Abrini J-Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities- Congrès International de Biochimie. Agadir; 2006, Vol. 09; pp12.
- Boukhatem M.N., Hamaidi M.S., Saidi F., Hakim Y., Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue « Nature et Technologie »*, 2010, Vol.3 ; pp. 37-45
- Bounatirou S., Smiti S., Miguel M.G., Flleiro L., Rejeb M.N., Neffati M., Costa M.M., Figueiredo A.C., Barosso J.G., Pedro L.G. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff.et Link. *Food Chemistry*; 2007, Vol. 105; pp 146-155.

- Bourrel C. Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Biochimie. Institut National Polytechnique de Toulouse. France 1993.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igetic, R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 2008, Vol. 111; pp 925–929.
- Brada M., Mohamed B., Michel M., Annabelle C. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de L'Algérie. *Biothmol. Argon. Soc. Environ*; 2007, 11(1) ; pp 3-7.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci Technol*, 1995, 28 (1), pp 25-30.
- Browne RW, Bloom MS, Schisterman EF, Hovey K, Trevisan M, Wu C, Liu A, Wactawski-Wende J. Analytical and biological variation of biomarkers of oxidative stress during the menstrual cycle. *Biomarkers*. 2008, 13(2): pp 160-83.
- Bruneton. J., Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3e édition, Edition Lavoisier TEC et DOC, 1999.
- Bruneton, J. Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : *Éditions médicales internationales, Tec et Doc Lavoisier, 1999 pp 1120.*
- Brunn N. Photosynthèse des monoterpènes chez les labiers (voie mécanisme et regulation). Labo. Phytochimie, UNV Lyon. 1987
- Burbott A. et Loomis P. Development, oil storage of dehiscence and peltate trichomes in *Thymus vulgaris*. *Nord J. Bot*, 1987, Vol.3; pp 245-504.

C

- Cano N., Barnoud D., Schneider SM., Vasson MP., Hasselmann M., Leverve X. Traité de nutrition artificielle de l'adulte 3^{ème} édition, 2007, XVII, pp 1189.
- Cao, G ; Alessio, H.M ; Cutler, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radic Biol Med* 1993, Vol. 14; pp 303-311.
- Cavé A. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Tec. Et Doc. Ed. Lavoisier, Paris ; 1993, pp 274-285.
- Chassaing V. L'Aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval; Ed: VIOLAINE CHASSAING ; 2006, pp: 4- 8.
- Choudhury R.P., Kumar A., Garg A.N-Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) for essential, trace and toxic elements and its antioxidant behavior-Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 2006, Vol. 41; pp 825-832.

- Clarke S. Essential oils; Ed 2: CHURCHILL LIVINGSTONE, ELSEVIER; 2008, pp: 42-77.
- Codoner- Franch P., Pons-Morales S., Boix-Garcia L., Valls-Bellés V. Oxidant/antioxidant status in obese children compared to pediatric patients with type 1 diabetes. *Pediatric Diabete*, 2010, 11 (4): pp 251-7.
- Codoner-Franch P., Valls-Belles V., Arilla Codoner A and Alonso-Eglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research December*. 2011
- Cosentino S, Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E and Palmas F-in vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils- *Letters in Applied Microbiology*; 1999, Vol. 29; pp 130-135.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Micobial. Rev.* 1999 ; 12 (4); pp 564 – 582.
- Crespo M.E., Gomis E., Jimenez J., Vavaro C.,. The essential oil of *Thymus serpylloides* ssp *gardorensis*. *Planta Medica*, 1988, Vol.2; pp 161-162.
- Crus Garcia T., Jimenez J., Navarro C., Cabo J., Cabo M.M. Sur l'huile essentielle de *Thymus longiflorus* Boiss. *Plantes Med. Phytother Tome XXII* 1988, (4), 22, pp 225-230.

D

- Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed).Paris. 2003, pp 317
- Daels-rakotoarison D. Extraits polyphénoliques d'aubepine, de cola et d'eglantier. Thèse de doctorat. Université de Lille II. France. 1999, 172 (64).
- Damaracky M., Rehak P., Juhas S., Koppel J-Effects of Selected Plant Essential Oils on the Growth and Development of Mouse Preimplantation Embryos In vivo- *Physiol. Res*; 2007, Vol. 56; pp 97-104.
- Deba, F., Xuan, T.D., Yasuda, M., Tawat, S.Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oil from *Bidens pilosa* L. Var. *Radiata*, *Food Chemistry*, 2008, Vol.19; pp 356-352.
- Debray M, Jacquemin H, Razafindrambo R. Travaux et documents de l'Orstom. (Paris, N°8). 1971
- DeGraft-Johnson, J., Kolodziejczyk, K., Krol, M., Nowak, P., Krol, B., Nowak, D. Ferric-Reducing Ability Power of Selected Plant Polyphenols and their Metabolites: Implications for Clinical Studies on the Antioxidant Effects of Fruits and Vegetable Consumption, *Basic & Clinical pharmacology & Toxicology*, 2007, Vol. 100; pp 345-352,.

- Deina M., Rosa A., Casu V., Cottiglia F., Bonsignore L. Natural product: their chemistry and biological significance. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 2003, Vol. 80; pp 65-70.
- Dewick P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach; Ed 2: JOHN WILEY & SONS; 2002 pp: 291- 398.
- Dimitrijevic S.I, Mihajlovski K.R., Antonovic D.G., Milanovic-Stevanovic M.R., Mijin D.Z-A study of the synergistic antilisterial effects of a sub- lethal dose of lactic acide and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L- *Food Chemistry*; 2007, Vol.104; pp 774-782.
- Ding, Z. T., Fang, Y. S., Tai, Z.G., Yang, M. H., Xu, Y. Q., Li, F., Cao, Q. E., Phenolic content and radical scavenging capacity of 31 species of ferns, Short report, *Fitoterapia* 2008, Vol.79; pp 581–583.
- Djeridane A., Yousfi M., Nedjmi D., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. Antioxydant activity of some medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*; 2006, Vol. 97; pp 654-660.
- Dob T, Dahmane D, Benabdelkader T, Chelghoum C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus fontanesii*- *Journal of pharmaceutical biology (Pharm. Bio.)*; 2006, Vol.44; N°8; pp 607-612.
- Dohou N., Yamni K., Tahrouch S. IDRISSE Hassani L.M., Badoc A., Gmira N. Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymeleae lythroïdes*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2003, Vol. 142; pp 61-78.
- Dorman H.J.D, et Deans S.G- Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils- *Journal of Applied Microbiology* ; 2000, Vol. 88; N°2, pp 308-316.
- Doughari J.H., Obidah J.S- In vitro antifungal activity of stem bark extracts of *Leptadenia lancifolia*- *International Journal of Integrative Biolog*, 2008, Vol. 3; N° 2; pp 111.
- Dugas A. J. Jr., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Nikolaus ., G.W. Winston, *J. Nat. Prod.*, 2000, 63, 327.

E

- Ebrahimi S.N., Mirjalili J.H, Sonboli A., Yousefzadi M-Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages- *Journal Food Chemis*; 2008, Vol. 10; pp 1016.
- Edris A.E., Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: A review-*Phytother. Res*; 2007, Vol. 21; pp 308-323.

- Elhabazi K., Dicko A., Desor F., Dalal A., Younos C., Soulimani R-Preliminary study on immunological and behavioural effects of *Thymus broussonetii* Boiss., an endemic species in Morocco-Journal of Ethnopharmacology; 2006, Vol 103,pp 413-419.
- El-Keltawi N.E. et Croteau R.,. Influence of ethephon and daminozide on growth and essential oil content of peppermint and sage. *Phytochem*, 1986 « a», Vol.25; pp 1285-1288.
- El-Keltawi N.E. et Croteau R.,. Influence of phosphon D and cycocel on growth and essential oil content of peppermint. *Phytochem*, 1986 « b», Vol. 25, pp 1603-1606.
- Elzaawely, A.A., Xuan, T.D., Tawata, S. Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt. Et R.M. Sm. Leaves exposed to copper sulphate, *Environmental and Experimental Botany*, 2007, Vol.59; pp 347-353.

F

- Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Braga, F.G., Coimbra, E.S., Scio, E., *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects, *Bioresource Technology*, 2009, Vol.100 ; pp 428-433.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*. 2008, Vol. 331 ; pp 372-379.
- Favier, A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité en chimie*, 2003, pp 108-115.
- Fellah S, Romadhane M, Abderraba M-Extraction et etude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*.L cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie-Journal de la Société Algérienne de Chimie J.Soc. Alger, Chin. ; 2006, Vol, 16 ; N° 2 ; pp 193-202.
- Fernandez X., Cabrol-bass D., Analyse des arômes, Techniques-Ingénieur. Sept. 2007, Vol. 10 ; pp. 32-33.
- Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports med* 2006b, Vol. 36 (4); pp 327-58.
- Flora SJS. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloïd exposure. Oxi Med Cel Long. 2009, Vol.2 : (4); pp 191 – 206.*
- Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C. Electron- Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH Radical assay, *Journal Org Chem*, 2004, Vol.69; pp 2309-2461.

G

- Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A., Rasooli I-Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils- Food Chemistry; 2007, Vol.102; pp: 898-904.
- Gardès-Albert M, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D. Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. 2003, pp: 91-96.
- Georgetti S.R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini Ana ECS et Fonseca Maria J.V. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. *AAPS Pharm Sci*. 2003, Vol. 5 (2): pp 5.
- Ghedira K. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 2005, Vol 3(4) ; pp 162-169.
- Gherman C, Culea M, Cozar O-Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS-Talanta; 2000, Vol. 53; PP 253-262.
- Girotti –Chanu C. Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine , flavone extraite de *mirotea de bilis* .thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon. 2006, pp 136.
- Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, Vol. 41 ; pp 1220-1234.
- Goto M, Ueda K, Hashimoto T, Fujiwara S, Matsuyama K, Kometani T, Kanazaw K. A formation mechanism for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine mediated by peroxidized 2'-deoxythymidine. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008, Vol.45; pp 1318–1325.
- Gueye P-M. Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-erythrocytaire sur le globule rouge .Thèse de Doctorat.Université Louis Pasteur Strosbourg. 2007, pp 247.
- Guignard J-L. Abrégé botanique. 2ème Edition Masson. Paris, 199. 1998
- Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R., Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. *Sixièmes Journées de la Recherche Avicole*. 2005, pp : 554-558.
- Gupta N., Agarwal M., Bhatia V., Jha S.K., Dinesh J. In vitro antioxidant activity of crude extracts of the plant *Glycosmis pentaphylla Correa*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2011, Vol. 6(2) ; pp 159-162.

H

- Hadi, M. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Thèse pour obtenir le titre de docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur, Domaine: Pharmacochimie, Université Strasbourg I, 2004, pp155.
- Haenen, G.R., Bast, A. Scavenging of hypochlorous acid by lipoic acid, *Biochem Pharmacol*, 1991, 42 (11), pp 06-2244.
- Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L. High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants, *Journal Agric Food Chem*, 1998, Vol 46 (5), pp 1887-1892.
- Hakan Ö., Münevver S., Medine G., Ahmet A., Fikretin S., Atalay S., Hamdullah K., Ozlem B. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of *Hippomarathrum microcarpum* (Bieb) from Turkey. *J.Agric. Food Chem.*; 2007, Vol 55; pp 937-942.
- Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C; Aruoma, O.The deoxyribose method: a simple .test-tube. assay for determination of rate constant for reaction of hydroxyl Radicals, *Anal. Biochem*, 1987, pp 1215-219.
- Halliwell, B., Murcia, M.A., Chirico, S., Aruoma, O.I. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1995, Vol.35; pp 07-20.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford : Clarendon Press ; 2006.
- Hamlat L.N. Flavonoïdes et acides phenoliques de *Pistacia lentiscus* ; Thèse de Magister. Ecole normale supérieure Kouba, Alger, 2006, pp 153.
- Han X., Shen T., Lou H. Dietary polyphenols and their biological significance. *Int J Mol Sci* 2007, Vol. 8(9); pp 950-988
- Haraguchi H., Saito T., Ishikawa H., Date H., Kataoka S. Tamura Y., Mizutani K., *Planta Med.*, 1996, 62, 217.
- Harborne, J. et Williams, C., *Advances in Flavonoid Research since 1992*, *Phytochemistry* 2000, Vol. 55; pp 481-504
- Heldt h.W. *Plant Biochemistry*; Ed 3: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2005, pp: 403-411.

- Hemwimon S., Pavasant P. & Shotiprux A.. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 2007, Vol.54 ; pp 44-50.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothér.* 2004, Vol. 1 ; pp 3 – 6.
- Hennebelle, T. Investigation chimique et chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants, Thèse de doctorat, Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille1, 2006, pp 304.
- Hennebelle T. Investigation chimique, chimio-taxonomique de Lamiales productrices d'antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larenda*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Chimie Organique et Macromoléculaire. Université des Sciences et Technologie de Lille-Lille 1, Ecole Doctorale Sciences de la Matière du Rayonnement et de l'Environnement. France. 2006
- Hernandez-Ochoa L.R. Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combine «Solvant/ Actif». D'origine végétale. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechniques de Toulouse. France. 2005
- Hilan C, Sfeir R, Jawish D et Aitour S-Huiles essentielles de certaines plantes medicinales libanaises de la famille des Lamiaceae-Lebanese *Science Journal* ; 2006, Vol.7 ; N°2.
- Hoffman L. Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes. Thèse de doctorat. Strasbourg, 2003, pp 245.
- Huang, D.J., Ou, B.X., Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal Agric Food Chem*, 2005, Vol 53 (6), pp 1841-1856.

I

- Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani, L., Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, Vol.21; pp 589– 598
- Inouye S., Abe S-Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse- *Phytothérapie* ; 2007, Vol. 1 ; pp 2-4.
- Ipek E., Zeytinoglu H., Okay S., Tuylu B.A., Kurkcuoglu M., Can Baser K.H-Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/ microsomal test-*Food Chemistry*; 2005, Vol. 93; pp 551-556.
- Iserin P. et al ; *Encyclopédie des plantes médicinales* ; Ed 2 : LAROUSSE ; 2007, pp 1-14.

●Ismaili H., Tortora S., Sosa S., Fkih -Tetouani S., Ildrissi A., Della Loggia R., Tubaro A., Aquino R., *J. Pharm. & Pharmacol.*, 2001, 53, 1645.

J

●Johnson, D.R., Gu, L.C. *In* Autoxidation and Antioxidants, *John Wiley, New York*, 1988, pp 433-448.

●Jukic M. et Milos M- Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.)- *Croatia Chemica Acta*; 2005, Vol. 78; N°1; pp 105-110.

K

●Kaloustian J., Chevalier J., Mikail C., Martino M., Abou L., Vergnes MF-Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne-Phytothérapie ; 2008, Vol. 6 ; pp 160-164

●Kandil O., Radwan N.M., Hassan A.B., Amer A.M.M., El-Banna H.A., Amer W.M.M., *J. Ethnopharmacol.*,1994, 44, 19.

●Kanko C., Swaliho B.E.H, Kone S., Koukoua G., N'Guessan Y.T. Etude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus*. *C.R. Chimie*; 2004, Vol. 7; pp 1039-1042.

●Kansole, M.M.R. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiales du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* Vahl et *Orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. Mémoire pour obtenir un diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso. 2009

●Kazuyasu S., Kazuki K., Hitoshi A., Gen-ichi D., *Agric J. & Food Chem.*, 1995, 43, 410.

●Khadri, A., Serralheiro, M.L.M., Nogueira, J.M.F., Neffati, M., Suti, S., Araujo, M.E.M. Antioxidant and anticholinesterase activities of essential oil from *Cymbopogon schoenanthus* L. Spreng. Determination of chemical composition by GC-mass spectrometry and ¹³C-NMR, *Food Chemistry*, 2008, Vol.109; pp 630-637.

●Kim D.O., Chun O.K., Kim Y. J., Moon H.Y., Lee C.Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, Vol. 51(22); pp 6509-6515.

●Kirschvink N, de Moffarts B, Lekeux P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*. 2008, Vol.177; pp 178–191.

●Kitagawa S., Fujisawa H., Sakurai H. Scavenging effect of dihydric and polyhydric phenols on superoxide anion radicals, studied by electron spin resonance spectrometry. *Chem Pharm Bull* 1992, Vol. 40(2); pp 304-307.

- Klervi L.L. Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différentes espèces de Sargassacées des Iles Salmon (Pacifique sud). 2005, pp 210.
- Koba K., Sanda K., Raynaud C. Millet J., Chaumont J.P.-Composition chimique des huiles essentielles d'*Aeollanthus pubescens* Benth. Acclimatée au Togo- C.R. Chimie ; 2004, Vol 7 ; pp 1107-1111
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002, Vol 30 ;pp 620 – 650.
- Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., De Groot, A., Evstatieva, L.N. (). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochem Anal*, 2001, Vol.13; pp 08-17.
- Kosaka K., Miyazaki H., Ito H., Osanai Y., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, CODEN: JKXXAF JP 2000072650 A2 20000307 Patent written in Japanese. Application: JP 98-244957 19980831. 2000, pp 6
- Kubola, J., Siriamornpun, S. Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia* L.) leaf stem and fruit fraction extracts *in vitro*, *Food Chemistry*, 2008, Vol. 110; pp 881-890.
- Kueny-Stotz M. Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylium sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat en Chimie organique, Université Louis Pasteur Strasbourg, France. 2008
- Kulevanova S., Panovska T.K., *Acta Pharmaceutica*, 2002, 52, 29
- Kulšić T., Dragovic-Uzelac V., Miloš M. Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.* 2006, Vol. 44 (4); pp 485-492.

L

- Laguerre, M., López-Giraldo, L.J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P. (). Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante, *Fondamental, OCL*, 2007, Vol.14 (5) ; pp 278-292.
- Lagunez Rivera L. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE ; 2006, pp 31-42.

- Lahlou M. Methods of Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential oils; Phytotherapy Research 18; WILEY & SONS; 2004, pp: 435- 448.
- Lamarti A, Badoc A, Deffieux G, Carde J.P. Biogénétique des monoterpènes- Bull. Soc. Pharm. Bordeaux ; 1994, Vol.133 ; pp 79-99.
- Lamarti A, Badoc A, Deffieux G, Carde J.P. Biogénétique des monoterpènes. III- Monoterpènes synthétases- Bull. Soc. Pharm. Bordeaux ; 1994, Vol, 133 ; pp 100-118.
- Laverdière F., Holstein A., Thiebaut L., Mallee R., Gravejat G., Dossier *Couplage*, 1999, pp 21.
- Lebham. Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO). 2005
- Lee S.J., Umamo K., Shibamoto T., Lee K.G- Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties-Food Chemistry; 2005, Vol. 91; pp 131-137.
- Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O *et al.* Stress oxydant et pathologies humaines. Press Med. 2001, Vol. 30 ; pp 1076 – 1081.
- Loukidi B. Contribution à l'étude de condensate du reste après hydro-distillation selon MORIS pendant l'isolation des huiles essentielles du *Thymus ciliatus* de Terny et Sidi Djilali ; leur analyse sur CCM et CPG. 1990
- Loziene K., Venskutonis P.R., Sipailiene A., Labokas J-Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes- Food Chemistry; 2007, Vol. 103; pp 546-559.
- Lucchesi M.E. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences, discipline ; Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies. 2005
- Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L. The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegedientsis* 2003, 1-4: 119-125.
- Lutge U., Kluge M., Bauer G. Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. Lavoisier .Paris. 2002, pp 211.

M

- Macheix J-J, Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Suisse : Lausanne ; Presses polytechniques et universitaires Romandes ; 2005.

- Mac Laren D. Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. 8. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier. 2007
- Madhuri S., Pandey G. Some anticancer medicinal plants of foreign origin. *Current Sci* 2009, Vol. 96(6) ; pp 779-783.
- Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta*, 2008, Vol.613; pp 01–19.
- Maihebiau P., La nouvelle aromathérapie: biochimie aromatique et influence psychosensorielle des odeurs. Lausanne. P : 635. Johnson I., " Antioxydants et anticancereux ", biofuture N° 186, 1994, pp 14-15,17.
- Maisuthisakul,P., Suttajit, M., Pongsawatmmit, R., Assessment of phenolic content and free radicalscavenging capacity of some Thai indigenous plants, *Food Chemistry*, 2007, Vol.100; pp 1409- 1418
- Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology*, 2007, Vol. 6(12) ; pp 1358-1368.
- Malecky M. Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins ; Thèse de Doctorat de l'Institut des Sciences et Industries de Vivant et de l'Environnement (Agr. Paris. Tech), INRA ; 2008, pp 27-35. ●Males, Z., Medic-Saric, M., Optimization of TLC analysis of flavonoids and phenolic acids of *Helleborus atrorubens* Waldst. Kit. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001, Vol. 24; pp 353–359
- Marfak A. Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. 2003, pp187
- Marfak, A., Radiolyse Gamma des Flavonoides. Etude de Leur Reactivite avec les Radicaux issus des Alcools : Formation de Depsides. Docteur de l'universite de limoges Spécialité : Biophysique, Universite de Limoges, Ecole Doctorale Sciences Biologie Santé, Faculté de Pharmacie, 2003, pp220.
- Martha Estrella Garcia Pérez. Caractérisation de composes phénoliques des extraits de ramilles du bouleau jaune: etude de leur capacité antioxydante. Diplôme de maitre en sciences du bois. Département des sciences du bois et du foret. Faculté de foresterie et geomatique. Université Laval. Québec. 2008
- Marxen, K., Vanselow, K.H., Lippemier, S., Hintze, R., Ruser, A., Hansen, U.P.

Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements, *Sensors*, 2007, Vol.7; pp 2080-2095.

●Mayachiew, P., Devahastin, S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts, *LWT*, 2008, Vol.41; pp 1153-1159.

●Marzouk Z., Neffati A., Marzouk B., Chraief I., Khemiss F., Chekir Ghedira L., Boukef K- Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine-Journal of Food Agriculture & Environment; 2006, Vol.4; N°3-4; pp 61-65.

●Medic- Saric M., Jasprica I., Smolcic-Bubalo A., Mornar A. Optimization of chromatographic condition in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica Chimica Acta*; 2004, Vol.77; pp 361-366.

●Milardovic, S., Ivekovic, D., Grabaric, B.S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical, *Bioelectrochemistry*, 2006, Vol.68; pp 175-265

●Miller R.E, McConville M.J, Woodrow I.E-Cyanogenic glycosides from the rare Australian endemic rainforest tree *Clerodendrum grayi* (Lamiaceae)-*Phytochemistry*; 2006, Vol. 67; pp 43-51.

●Mohanty P., Hamouda W., Garg R., et al. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab*; 2000, Vol. 85; pp 2970-3.

●Moro Buronzo A. *Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être*; Ed : HACHETTE PRATIQUE; 2008 pp 14- 43.

N

●Naghdi B.H., Yazdani D., Mohammed Ali S., Nazari F-Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme. *Thymus vulgaris* L-*Industrial Crops and Products*; 2004, Vol.19; pp 231-236.

●Naghbi F, Mosaddegh M, Mohammadi M.S et Ghorbani A-Labiatae Family in folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to Pharmacology-Iranian journal of pharmaceutical research ; 2005, vol. 2; pp 63-79.

●Nickavar B., Mojab F., Dolat-Abadi R-Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran-*Food Chemistry*; 2005, Vol. 90; pp 609-611.

O

- O'Kennedy R, Thomes R D, éditeurs. Coumarins : biology, applications and mode of action. New York, NY : John Wiley & Sons, Inc ; 1997.
- Okwu D.E, Okwu M.E. Chemical composition of *Spondias mombin* Linn. Plant Parts. *J Sustain Agric Environ* 2004, Vol. 6(2); pp 140-147.
- Ou, B.X., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Prior, R.L., Huang, D.J. Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe, *Journal Agric Food Chem*, 2002, Vol. 50 (10); pp 2772-2777.
- Ouraini D., Agoumi A., Alaoui M.I., Alaoui K., Cherrah Y., Alaoui M.A., Belabbas M.A- Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques-Phytothérapie ; 2007, Vol. 1; pp 6-14.
- Oussala M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M- Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat-Meat Science ; 2006, Vol. 73; pp 236-244.
- Oyedeji O., M. Oziegbe, Taiwo F.O. Antibacterial, antifungal and phytochemical analysis of crude extracts from the leaves of *Ludwigia abyssinica* A. Rich. and *Ludwigia decurrens* Walter. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011, Vol. 5(7); pp 1192-1199.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, A. (). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leafextracts, *Food Chemistry*, 2008, Vol. 110; pp571–583.

P

- Pandey KB et Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009, Vol. 2 (5) ; pp 270 – 278.
- Pan, Y., Wang, K., Huang, S., Wang, H., Mu, X., He, C., Ji, X., Zhang, J., Huang, F., Antioxydantactivity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel, *Food Chemistry*, 2008, Vol.106; pp 1264-1270
- Panovska T.K. *In vitro* antioxydant activity of some *Tencrium* species (Lamiaceae). *Acta Pharm.* 2005, Vol. 55; pp 207-214.
- Parejo I; Viladomat F; Bastida J; Rosas-Romero A; Flerlage N; Burillo J; Codina C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem*; 2002, Vol. 50; pp 6882–90.
- Paris R, Moyse H. Précis de matière médicinale. Paris: Masson. 1969

- Patel C., Ghanim H., Ravishankar S., et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-Kappa B activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, Vol. 92 ; pp 4476-9.
- Pauli A., Knobloch K- Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi-Z Lebensm Unters Forsch ; 1987, Vol.185 ; pp 10-13.
- Perez, C., Sanchez, J., Marmol, F., Puig-Parellada, P., Pouplana, R. Reactivity of Biologically Important NSAID Compounds with Superoxide O₂⁻, nitric oxide .NO and Cyclooxygenase Inhibition, *QSAR Comb Sci*, 2007, Vol.26 (3); pp 368-377.
- Peronny S. La perception gustative et la consommation des tannins chez le MAKI (Lemur Catta).Thèse de Doctorat du Muséum national d'histoire naturelle .Discipline Eco-Ethologie. 2005, pp 151
- Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne JO. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. 2002, Vol 16, Issue 4, pp 233-239.
- Piochon M. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire, Université du Québec à Chicoutimi, Canada. 2008
- Pourmortazavi S.M.& Hajimirsadeghi S.S. "Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis" *Journal of Chromatography A*, 2007, Vol. 1162; pp 2- 24.
- Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB. Experimental guidelines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2010, Vol. 20; pp 2–14.
- Prabuseeninivasan S., Jajakumar M., Ignacimuthu S- In vitro antibacterial activity of some plant essential oils; *BioMed Central Complementart and Alternative Medicine*. 2006, Vol. 6; N° 39.

Q

- Quezel P., et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. C.N.R.S. Paris. 1963
- Organisation Mondiale de la Santé (2009). La médecine traditionnelle, principaux points, centre des medias, onglet : programmes et projets. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/fr/>, mis à jour 2009, visité le 07/02/2009.

R

- Rasekh H.R., Khoshnood-Mansourkhani M.J., Kamalinejad M. Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. *Fetoterapia*; 2001, Vol.72; pp 937-939.
- Rasooli I., Rezaei M.B., Allameh A- Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*-International Journal of Infectious Diseases ; 2006, Vol. 10; pp 236-241.
- Rizk A.M. Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*, 1982, Vol. 52 (2); pp 35-42.
- Rizzo AM., Berselli P., Zava S., et al. Endogenous antioxidants and radical scavengers. *Adv Exp Med Biol* 2011, Vol. 698; pp 52-67.
- Roberts RA., Smith RA., Safe S., et al. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. *Toxicology*, 2010, Vol. 276; pp 285-94.
- Roginsky, V., Lissi, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chem*, 2005, Vol. 92 (2); pp 235-254.
- Rota M.C., Herrera A., Martinez R.M., Sotomayor J.A., Jordan M.J-Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils-*Food Control*; 2008, Vol.19; pp 681-687.
- Roux D. Conseil en aromathérapie. 2^{ème} édition, *Pro-Officina.*, 2008, pp 187.
- Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis*, 1989, Vol.10 (6), 1003-1008.

S

- Saeki Y., Ito, Yoshio Y., Shibata M., Sato, Yoshinori Y., Okuda K., Takazoe I., *Bulletin of Tokyo Dental College*,1989, Vol. 30; pp 129.
- Saidj F-Extraction de l'huile essentielle de thym : *Thymus numidicus kabylica*-Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques ; université M'Hamed Bougara-Boumerdes.2006
- Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G. Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann Ist Super Sanità*. 2008, Vol. 41(2); pp 143-164.
- Scherer, R., Godoy, H.T., Antioxydant Activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry*, 2009, Vol. 112; pp 654-658
- Sevanian A ., Nordenbrand K ., Kim E ., Ernester L ., Hochstein P. Microsomal lipid peroxidation : The role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 .*Free Radic Biol Med*, 1990, Vol. 8; pp 145-152

- Sharif Ali S., Kasoju N., Luthra A., Singh A., Sharanabasava H., Sahuand A., Bora U. Indian medicinal herbs as source of antioxidants. *Food Res Int* 2008, Vol. 41; pp 1-15
- Sharififar, F., Dehghn-Nudeh, G., Mirtajaldini, M., Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L., *Food Chemistry*, 2009, Vol.112; pp 885-888,.
- Shon, M., Lee, J., Choi, J., Choi, S., Nam, S., Seo, K., Lee, S., Sung, N., Park, S., Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *chungkukjang* , *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, Vol.20; pp 113-118
- Silou T., Malanda M., Loubaki L-Optimisation de l'extraction de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* grâce à un plan factoriel complet 2³- *Journal of Food Engineering* ; 2004, Vol 65 ; pp 219-223.
- Simonnet X., Gaudin M., Jacquemettaz P., Plantini U., Rey C. Stade phénologique et qualité des hampes florales du genépi blanc. *Revue Suisse Vitic. Arbortic* ; 2006, Vol.38 (3) ; pp 189-193.
- Singh R., Singh S.K., Arora S. Evaluation of antioxidant potential of ethyl acetate extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. *Fod Chem. Toxicol* 2007, Vol.45; 1216-1223.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods Enzymol*, 1999, Vol. 299; pp 152-178.
- Skerget M ., Kotnik P ., Hadolin M ., Hras A-R ., Simonic M ., Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities . *Food chemistry*, 2005, Vol. 89; pp191-198.
- Sofowra A. Medicinal Plants And traditional Medicine In Africa. 2e Edition. Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria, 1993.
- Sokol-Letowska A., Oszmiansk J., wojdylo A. Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 2007, Vol. 103; pp 853-859.
- Soto-Mendivil E.A., Moreno-Rodriguez J.F., Estarron-Espinosa M., Garcia-Fajardo JA et Obledo-Vazquez E.N-Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*-E-Gnosis [online]; 2006, Vol. 4; N° 16.
- Sticker Vo, et Fluck H. Die ensammen seteung von genvinen, extrahierten und destilhelvetiae, 1968, Vol. 43; pp 411-446.
- Sun BS, Ricardo-Da-Silva JM, Spranger MI. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 1998, Vol.46; pp 4267-4274

- Sun, J., Blaskovich, M.A., Jove, R., Livingston, S.K., Coppola, D., Sebt, S.M. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity, *Oncogene*, 2005, Vol. 24; pp 3236–3245.
- Suzgeç S., Meriçli A.H., Houghton P.J., Çubukçu B. Flavonoïdes of *Helichrysum compactum* and their antioxydant and antibacterial activity. *Fitoterapia*; 2005, Vol. 76; pp 269-272.
- Svoboda K.P et Hampson J.B. Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Departement. SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW. 1999
- Szentandrassy N., Szentesi P., Magyar J., Nanasi P.P and Csernoch L- Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle-BMC Pharmacology; 2003, Vol.3; pp 9.

T

- Tanaka H., (Narisu Cosmetic Co., Ltd., Japan). Jpn. Kokai Tokkyo Koho., Division of Jpn. Kokai Tokkyo Koho Appl. No. 01 189.690. CODEN: JKXXAF JP 2003002811 A2 20030108 Patent written in Japanese. Application: JP 2001-341489 20010622. 2003, pp 10
- Thuille N., Fille M., Nagl M. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health*. 2003, Vol. 206; pp 217-221.
- Tian, F., Li, B., Ji, B., Yang, J., Zhang, G., Chen, Y., Luo, Y., Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities, *Food Chemistry*, 2009, Vol. 113; pp 173-179
- Trease E., Evans W.C. Pharmacognosie. Billiare Tindall. *London 13th Edition*. P, 61-62. In Karumi Y., Onyeyili P.A. et Ogugbuaja V.O. Identification des principes actif de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (*Baume du pomme*). *Journal of Medicine and Scientific*. 1987, Vol.4 (3); pp 179-182. Nigeria. ISSN 1682-4474.
- Tsao, R., Yang, R., Young, J.C. Antioxidant Isoflavones in Osage orange, *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid, *Journal Agric Food Chem*, 2003, Vol. 51 (22); pp 6445-6451.

U

- Uchida S., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Nonaka G., Nishioka I., Niwa M., Ozaki M. Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Med Sci Res* 1987, Vol. 15; pp 831-832.

V

- Vasco, C., Ruales, J., Kamal-Eldin, A., Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador, *Food Chemistry* 2008, Vol. 111; pp 816–823
- Venderjagt T.J., Ghattas R., Venderjagt D. J., Crossey M., Glew R.H. Comparisan of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico . *Life Sciences*; 2002, Vol. 70; pp 1035-1040.
- Vermeris, W. Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht. ISBN-10 1- 4020-5163-8 (HB). 2006
- Verpoorte R. et Alfermann A.W. Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism; Ed: KLUWER ACADEMIC; 2000, pp: 1- 23.
- Vriesman, M.F., Haenen, G.R., Westerveld, G.J., Paquay, J.B.G., Voss, H.P., Bast, A. *Pharm World Sci*, 1997, Vol. 19, pp 283-326.

W

- Wang H., Zhao M., Yang B., Jiang Y., Rao G. Identification of polyphenols I tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities. *Food Chimistry*; 2008, Vol.107; pp1399-1406.
- Wilkinson, F., Helman, W.P., Ross, A.B. Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution, *Journal Phys Chem*, 1995, Vol. 24; pp 590-663.
- Williams C.A., Grayer R.J. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.*, 2004, Vol. 21(4); pp 539-573.
- Wink M. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism; Annual Plant Reviews 40; Ed: WILEY-BLACKWELL, 2010, pp 1-23.
- Wong S.P.,Leong L.P., Koh J.H.W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*; 2006, Vol. 99; pp 775-783.

Y

- Yang, J., Guo, J., Yuan, J. *In vitro* antioxidant properties of rutin, *LWT*, 2008, Vol. 41; pp 1060-1066.
- Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, Vol.49; pp 4083–4089.

Z

- Zhang, S.Y., Zheng, C.G., Yan, X.Y., Tian, W.X. Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Communications*, 2008, Vol. 371; pp 654-658.
- Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid Biosynthesis : Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* 2008, Vol. 59; pp 735 – 769.

Annexe

Annexe 01 : Epuisement du matériel végétal

L'épuisement est réalisé dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant contenant 50g de poudre de matériel végétal en présence de 300ml de solvant: éthanol ou eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange est filtré et soumis à différents tests.

Annexe 02 : Préparation de l'infusé aqueux

Une masse de 5g de poudre végétale est mise dans 100ml d'eau bouillante pendant 15 minutes.

Nous avons filtré les extraits sur du papier filtre et rincé avec de l'eau chaude de manière à obtenir 100ml (**Paris et al., 1969**).

Annexe 03: Réactifs et réaction de caractérisation

Les réactifs utilisés lors des tests sont les suivants :

●**Réactif de Wagner** : Dissoudre 2g de KI et 1,27g d'I₂ dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100ml d'eau.

●**Réactif de Mayer** : Dissoudre 1,358 g de HgCl₂ dans 60ml d'eau et également 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100ml d'eau.

●**Réactif d'amidon** : Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5g d'iodure de potassium. Chauffer dans un bain marie 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition.

●**Réactif de Liebermann-Burchardt** : Mélanger 5 ml de la solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter le tout et laisser la solution reposer pendant 30 minutes à 21°C.

Annexe 04: Valeurs moyennes de l'absorbance de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Concentration (mg/mL)	4,637	9,274	12,911	18,548	23,185	27,822	32,459	39,096
Moyenne de l'absorbance à 725nm	0,09	0,186	0,264	0,408	0,493	0,632	0,738	0,933

Annexe 05: Valeurs moyennes de l'absorbance de la courbe d'étalonnage de la catéchine.

Concentration (mg/mL)	0,25	0,5	0,75	1	2	3	4	5
Moyenne de l'absorbance à 510nm	0,063	0,112	0,168	0,236	0,422	0,669	0,877	1,066

Annexe 06 : Valeurs du piégeage du radical DPPH exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la partie aérienne de la ssp coloratus en fonction des concentrations (mg/mL).

Concentration (mg/mL)	0,80	0,85	0,90	1	1,25	1,5	2	2,5
DO (extrait brut)	0,447 ±0,004	0,377 ±0,004	0,370 ±0,000	0,320 ±0,002	0,254 ±0,032	0,237 ±0,003	0,108 ±0,012	0,036 ±0,005

Concentration (mg/mL)	0,25	0,5	0,75	0,85	0,90	1	1,25	1,5
DO (extrait brut)	0,405 ±0,074	0,375 ±0,024	0,308 ±0,028	0,294 ±0,007	0,288 ±0,011	0,248 ±0,041	0,197 ±0,010	0,036 ±0,014

Concentration (mg/mL)	0,90	0,95	1	1,25	1,5	2	2,5	2,75
DO (n-butanol)	0,440 ±0,011	0,428 ±0,019	0,415 ±0,007	0,357 ±0,048	0,287 ±0,014	0,170 ±0,079	0,161 ±0,009	0,156 ±0,002

Concentration (mg/mL)	0,15	0,20	0,30	0,35	0,40	0,50	0,60	0,70
DO (tanin)	0,431 ±0,001	0,415 ±0,010	0,363 ±0,001	0,300 ±0,002	0,215 ±0,002	0,195 ±0,060	0,183 ±0,000	0,160 ±0,002

Annexe 07 : Valeurs du piégeage du radical DPPH exprimées en densités optique (D.O) par les extraits des racines de la ssp coloratus en fonction des concentrations (mg/ml).

Concentration (mg/mL)	4	4,75	5,5	5,75	6	6,5	6,75	7,5	7,75
DO (extrait brut)	0,4 ±0,001	0,381 ±0,015	0,356 ±0,042	0,344 ±0,057	0,326 ±0,059	0,3 ±0,067	0,271 ±0,082	0,223 ±0,046	0,207 ±0,009

Concentration (mg/mL)	3,5	3,75	4	4,5	4,75	6	6,5	6,75
DO (acétate d'éthyle)	0,463 ±0,005	0,447 ±0,003	0,433 ±0,016	0,343 ±0,002	0,323 ±0,027	0,199 ±0,009	0,174 ±0,002	0,147 ±0,004

Concentration (mg/mL)	4	5	5,25	5,5	5,75	6,25	6,5	6,75	6,95
DO (n-butanol)	0,433 ±0,027	0,415 ±0,012	0,357 ±0,013	0,343 ±0,009	0,329 ±0,007	0,326 ±0,008	0,313 ±0,002	0,288 ±0,019	0,268 ±0,004

Concentration (mg/mL)	3,5	3,75	4	4,25	4,5	5	5,5	6	6,5
DO (tanin)	0,378 ±0,009	0,365 ±0,006	0,327 ±0,004	0,321 ±0,004	0,260 ±0,000	0,258 ±0,000	0,252 ±0,018	0,209 ±0,004	0,190 ±0,006

Annexe 08: Valeurs du piégeage du radical DPPH exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la partie aérienne de la ssp *eucliliatus* en fonction des concentrations (mg/ml).

Concentration (mg/mL)	0,5	0,6	0,65	0,7	0,75	0,85	0,90	1
DO (extrait brut)	0,422 ±0,004	0,378 ±0,007	0,362 ±0,015	0,319 ±0,004	0,308 ±0,002	0,284 ±0,004	0,240 ±0,074	0,228 ±0,041

Concentration (mg/mL)	2	2,5	2,75	3	3,5	3,75	4	4,5
DO (acétate d'éthyle)	0,461 ±0,012	0,387 ±0,024	0,346 ±0,000	0,286 ±0,028	0,241 ±0,007	0,238 ±0,043	0,215 ±0,020	0,167 ±0,031

Concentration (mg/mL)	0,65	0,75	0,80	0,85	0,90	0,95	1	1,5
DO (n-butanol)	0,5 ±0,002	0,484 ±0,001	0,417 ±0,002	0,361 ±0,001	0,336 ±0,007	0,312 ±0,002	0,301 ±0,002	0,288 ±0,004

Concentration (mg/mL)	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45
DO (tanin)	0,638 ±0,016	0,566 ±0,007	0,513 ±0,000	0,406 ±0,022	0,379 ±0,014	0,372 ±0,031	0,213 ±0,000	0,182 ±0,024

Annexe 09: Valeurs du piégeage du radical DPPH exprimées en densités optique (D.O) par les extraits des racines de la ssp euciliatus en fonction des concentrations (mg/ml).

Concentration (mg/mL)	0,60	0,75	1	1,5	2	3	3,75	4
DO (extrait brut)	0,446 ±0,002	0,430 ±0,000	0,405 ±0,020	0,295 ±0,049	0,104 ±0,042	0,064 ±0,011	0,055 ±0,003	0,038 ±0,001

Concentration (mg/mL)	0,5	0,75	0,85	1	1,5	1,75	2	3
DO (acétate d'éthyle)	0,457 ±0,009	0,430 ±0,004	0,384 ±0,065	0,323 ±0,002	0,120 ±0,001	0,082 ±0,004	0,049 ±0,002	0,027 ±0,001

Concentration (mg/mL)	2	3	4	5	6	7	8	8,5
DO (n- butanol)	0,518 ±0,002	0,472 ±0,002	0,380 ±0,001	0,391 ±0,002	0,324 ±0,001	0,171 ±0,001	0,140 ±0,001	0,136 ±0,001

Concentration (mg/mL)	0,35	0,45	0,5	0,65	0,75	1	2	3
DO (tanin)	0,475 ±0,002	0,459 ±0,001	0,366 ±0,004	0,279 ±0,002	0,220 ±0,001	0,069 ±0,001	0,039 ±0,001	0,031 ±0,002

Annexe 10: Valeurs du piégeage du radical DPPH exprimées en densités optique (D.O) pour l'acide ascorbique en fonction des concentrations (mg/ml).

Concentration (mg/mL)	0,5	0,9	1	1,25	1,5	1,80	1,85	1,95	2
DO (acide)	0,499	0,488	0,396	0,351	0,271	0,196	0,173	0,170	0,153

ascorbique)	±0,000	±0,007	±0,005	±0,003	±0,002	±0,024	±0,034	±0,013	±0,068
-------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Annexe 11 : Valeurs du piégeage du radical DPPH exprimées en densités optique (D.O) pour le BHA en fonction des concentrations (mg/ml).

Concentration (mg/mL)	0,5	1	1,25	1,5	1,75	1,80	1,85	2	2,25
DO (BHA)	0,495 ±0,004	0,478 ±0,004	0,438 ±0,008	0,391 ±0,012	0,355 ±0,043	0,341 ±0,004	0,317 ±0,003	0,278 ±0,016	0,209 ±0,002

Annexe12 : Valeurs du pouvoir réducteur exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la ssp coloratus (partie aérienne).

DO Concentration	Extrait brut	Fraction d'acétate d'éthyle	n-butanol	Tannin
0,1	0,038±0	0,093±0,002	0,042±0,001	0,176±0,005
0,25	0,203±0,002	0,169±0,007	0,090±0,023	0,486±0,010
0,5	0,379±0,004	0,386±0,002	0,204±0,033	1,149±0,000
0,75	0,568±0,009	0,626±0,017	0,410±0,006	1,424±0,190
1	0,712±0,001	0,707±0,125	0,474±0,041	1,650±0,009
1,25	0,810±0,002	0,865±0,012	0,610±0,002	1,764±0,002

Annexe 13 : Valeurs du pouvoir réducteur exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la ssp coloratus (Racine).

DO Concentration	Extrait brut	fraction d'acétate d'éthyle	n-butanol	Tannin
0,1	0,017±0,000	0,055±0,001	0,012±0,000	0,111±0,001
0,25	0,028±0,002	0,081±0,001	0,024±0,001	0,114±0,000
0,5	0,049±0,001	0,095±0,001	0,052±0,000	0,125±0,001
0,75	0,087±0,001	0,101±0,001	0,078±0,003	0,181±0,001
1	0,105±0,001	0,202±0,002	0,083±0,000	0,250±0,004
1,25	0,117±0,001	0,318±0,002	0,091±0,001	0,263±0,001

Annexe14: Valeurs du pouvoir réducteur exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la ssp euciliatus (partie aérienne).

DO Concentration	Extrait brut	Fraction d'acétate d'éthyle	n-butanol	Tannin
0,1	0,118±0,000	0,026±0,000	0,106±0,002	0,251±0,007
0,25	0,195±0,001	0,078±0,001	0,174±0,002	0,707±0,010
0,5	0,38±0,005	0,131±0,007	0,388±0,005	1,614±0,027
0,75	0,542±0,001	0,226±0,000	0,512±0,002	1,858±0,002
1	0,712±0,004	0,292±0	0,692±0,004	1,992±0,000
1,25	0,817±0,007	0,366±0,005	0,795±0,007	2,110±0,002
1,5	1,005±0,007	0,465±0,041	0,833±0,012	2,221±0,002

Annexe15: Valeurs du pouvoir réducteur exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la ssp euciliatus (racine).

DO Concentration	Extrait brut	Fraction d'acétate d'éthyle	n-butanol	Tannin
0,1	0,105±0,002	0,02±0,009	0,067±0,003	0,112±0,002
0,25	0,174±0,005	0,177±0,000	0,068±0,004	0,357±0,007
0,5	0,338±0,002	0,306±0,002	0,127±0,005	0,654±0,000
0,75	0,480±0,001	0,490±0,003	0,155±0,002	0,951±0,007
1	0,685±0,004	0,669±0,000	0,206±0,034	1,278±0,038
1,25	0,765±0,004	0,833±0,009	0,274±0,021	1,374±0,064

Annexe 16: Valeurs du pouvoir réducteur exprimées en densités optique (D.O) pour l'acide Ascorbique et le BHA.

Concentration	DO de l'acide Ascorbique	DO de BHA
0,1	0,055±0,009	0,087±0,008
0,25	0,162±0,000	0,160±0,012
0,5	0,314±0,004	0,294±0,005
0,75	0,463±0,006	0,412±0,000
1	0,603±0,012	0,573±0,004
1,25	0,710±0,002	0,745±0,007

Annexe 17 : Valeurs de l'activité antioxydante de la décoloration de la β -carotène exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la ssp coloratus (partie aérienne).

Temps (minutes)	BHA	Contrôle	Extrait brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Tanin
0	0,772	0,300	0,822	0,864	0,780	0,922
10	0,765	0,220	0,812	0,856	0,774	0,916
20	0,754	0,185	0,798	0,842	0,762	0,908
30	0,730	0,166	0,779	0,823	0,746	0,872
40	0,698	0,140	0,765	0,812	0,726	0,868
50	0,692	0,120	0,760	0,800	0,700	0,860
60	0,680	0,065	0,740	0,785	0,696	0,856

Annexe 18: Valeurs de l'activité antioxydante de la décoloration de la β -carotène exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la ssp coloratus (racine).

Temps (minutes)	BHA	Contrôle	Extrait brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Tanin
0	0,772	0,300	0,460	0,540	0,540	0,320
10	0,765	0,220	0,480	0,532	0,532	0,303
20	0,754	0,185	0,430	0,505	0,505	0,272
30	0,730	0,166	0,380	0,492	0,492	0,268
40	0,698	0,140	0,326	0,475	0,475	0,244
50	0,692	0,120	0,310	0,460	0,460	0,235
60	0,680	0,065	0,320	0,380	0,380	0,215

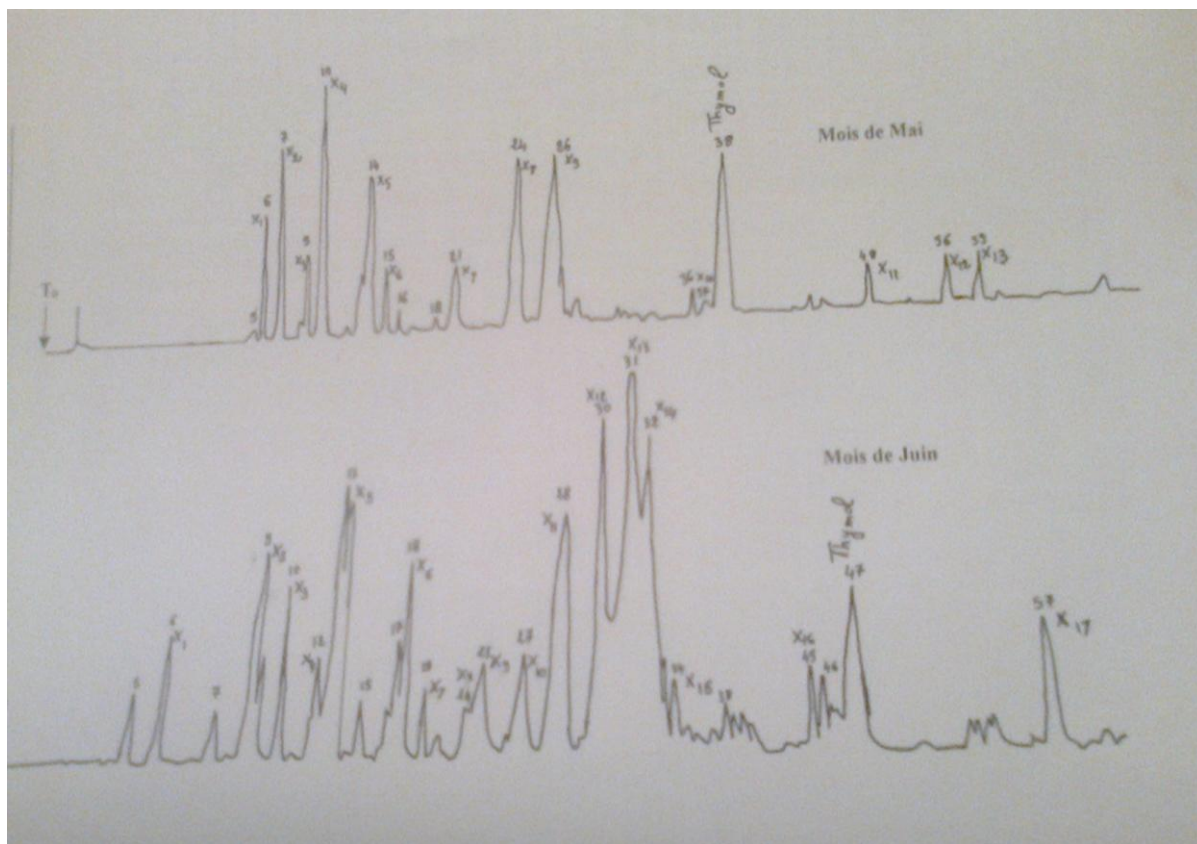
Annexe 19: Valeurs de l'activité antioxydante de la décoloration de la β -carotène exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la ssp *euciliatus* (partie aérienne).

Temps (minutes)	BHA	Contrôle	Extrait brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Tanin
0	0,772	0,300	0,835	0,435	0,802	0,956
10	0,765	0,220	0,824	0,377	0,796	0,935
20	0,754	0,185	0,816	0,362	0,779	0,926
30	0,730	0,166	0,804	0,357	0,759	0,916
40	0,698	0,140	0,783	0,335	0,742	0,905
50	0,692	0,120	0,773	0,333	0,730	0,890
60	0,680	0,065	0,760	0,326	0,722	0,886

Annexe 20: Valeurs de l'activité antioxydante de la décoloration de la β -carotène exprimées en densités optique (D.O) par les extraits de la ssp *euciliatus* (racine).

Temps (minutes)	BHA	Contrôle	Extrait brut	Fraction acétate d'éthyle	Fraction butanolique	Tanin
0	0,772	0,300	0,783	0,832	0,398	0,876
10	0,765	0,220	0,770	0,825	0,376	0,865
20	0,754	0,185	0,762	0,788	0,345	0,854
30	0,730	0,166	0,743	0,775	0,286	0,846
40	0,698	0,140	0,728	0,772	0,268	0,833
50	0,692	0,120	0,710	0,769	0,254	0,800
60	0,680	0,065	0,702	0,760	0,233	0,798

Annexe 21 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* au mois de Mai et Juin.



Annexe 22: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* ssp *euciliatus* au mois de Juin et Juillet.

